
ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

RECHERCHES SUR LE CHOLÉRA ET LES VIBRIONS

PAR EL. METCHNIKOFF

TROISIÈME MÉMOIRE

SUR LA VARIATION ARTIFICIELLE DU VIBRION CHOLÉRIQUE

AVEC LA PLANCHE X

I

APERÇU DES TRAVAUX RÉCENTS SUR LE MICROBE DU CHOLÉRA

Dans mes deux premiers mémoires (ces *Annales*, 1893, n^{os} 5 et 7), j'ai surtout tâché d'établir les propositions suivantes : 1^o le vibron de Koch est l'agent producteur du choléra asiatique ; 2^o l'immunité et la guérison dans cette maladie ne peuvent nullement être attribuées à la propriété préventive du sang ; 3^o l'immunité des animaux contre la péritonite expérimentale, provoquée par le vibron cholérique, est due surtout à la fonction phagocytaire des cellules ; 4^o ce vibron ressemble à tel point à plusieurs de ses congénères que son diagnostic se heurte à de très grandes difficultés.

Avant d'aborder le sujet spécial de notre mémoire actuel, il faut s'arrêter sur certaines publications récentes se rattachant aux points que nous venons de mentionner.

Bien peu nombreuses ont été les voix des adversaires du rôle étiologique du vibron de Koch. La plupart ont dû reconnaître que ce microbe doit être considéré comme le véritable producteur du choléra asiatique. Cependant M. Drasche, qui déjà depuis longtemps s'est élevé contre la valeur étiologique du vibron, vient de publier une série d'articles ¹ consacrés

1. *Wiener medic. Wochenschrift*, 1894.

à un réquisitoire sévère contre la doctrine de Koch. Il y réunit toute sorte d'arguments contre cette théorie du bacille virgule, et arrive à conclure que l'effet pathogène du vibron de Koch ne ressemble nullement au choléra et que d'autres bactéries peuvent engendrer chez l'homme exactement les mêmes symptômes. M. Drasche s'appuie surtout sur quelques expériences avec un streptocoque, isolé des selles d'un malade de choléra *nostras*. Avalé par plusieurs individus, ce microbe a provoqué une diarrhée semblable à celle qui a été observée dans plusieurs expériences avec le vibron cholérique.

Pour soutenir sa thèse, M. Drasche a dû faire la critique de l'expérience sur l'homme, relatée dans mon second mémoire, expérience qui a abouti à un accès de choléra asiatique véritable. M. Drasche conteste ce fait. Il me reproche le manque de détails cliniques et s'étonne de ce que, dans le cas en question, les selles riziformes s'étaient brusquement transformées en déjections moulées, ce qu'on n'observe jamais dans le vrai choléra. M. Drasche a raison en cela, mais il se trompe fortement dans l'exposé des faits. Jamais il n'a été dit dans mon mémoire que cette transformation se fût accomplie. En réalité, dans ce cas de choléra expérimental, les selles riziformes se sont maintenues pendant deux jours et ont cédé la place à une diarrhée très liquide mais colorée. Ce n'est que le onzième jour de la maladie qu'apparut la première déjection moulée.

La description de la maladie que j'ai donnée dans mon mémoire, ainsi que les notes supplémentaires de cette page des *Annales* (1893), suffisent pleinement pour prouver qu'il s'agissait incontestablement d'un cas de vrai choléra. Aussi les cliniciens très expérimentés qui l'ont observé n'ont pas eu le moindre scrupule pour poser le diagnostic.

Les doutes qui ont été exprimés par M. Drasche et par quelques autres critiques ne peuvent donc persister, de sorte que le fait, que le vibron de Koch est l'agent producteur du choléra, reste définitivement établi.

Comme d'un côté il a été impossible d'obtenir, avec le vibron de Koch, chez des animaux, une affection intestinale semblable au choléra¹, et comme, d'un autre côté, les expériences sur

1. Je décrirai prochainement un moyen d'obtenir le vrai choléra intestinal chez les animaux.

l'homme peuvent être très dangereuses, les savants ont cherché une méthode facile pour juger de l'état réfractaire de l'organisme vis-à-vis du choléra. On a pensé, et c'est surtout M. G. Klemperer qui a fait des recherches nombreuses dans cette voie, que la propriété du sang humain de prévenir la péritonite des animaux, provoquée par l'injection des vibrions cholériques, pouvait fournir une mesure facile et exacte de l'immunité de l'homme contre le choléra. Des expériences variées, que j'ai résumées dans mon premier mémoire sur le choléra, m'ont appris que cette méthode n'était pas sûre. Le sang des individus qui guérissent de cette maladie peut ne pas être préventif, tandis que le sang des personnes qui meurent du choléra peut, comme cela a déjà été démontré par M. Botkine, préserver les cobayes de la péritonite vibronnienne. Dans les cas où ce pouvoir préventif était manifeste, la quantité de sérum nécessaire pour obtenir un effet était tellement variable qu'il était impossible de l'employer comme mesure de l'état réfractaire. Je me suis donc prononcé en principe contre l'application de cette méthode dans les recherches sur la vaccination.

Depuis ma publication, cette propriété préventive a été étudiée par plusieurs savants tels que M. Lazarrus¹, R. Pfeiffer², mais surtout par M. Issaëff³, dans un travail exécuté à l'Institut du professeur Koch à Berlin. Les résultats de toutes ces observations concordent parfaitement avec les déductions que j'avais formulées dans mes deux premiers mémoires. Ainsi M. Issaëff s'est assuré que le sérum sanguin, retiré six et huit jours après le début de la guérison de deux individus atteints de choléra grave, ne manifestait aucun pouvoir préventif. La guérison, comme dans les cas que j'avais cités dans mon premier mémoire, ne peut donc nullement être expliquée par la propriété préventive du sérum.

D'un autre côté, M. Pfeiffer (*l. c.*, p. 284) signale le fait que « les cobayes, à l'époque où leur sang a déjà perdu sa propriété préventive, sont néanmoins encore réfractaires contre le virus cholérique ». Il en conclut, conformément à mes affirmations antérieures, « qu'il est inexact d'identifier l'immunité avec un changement spécifique du sang ».

1. *Berl. klin. Wochenschr.*, 1893, n° 51.

2. *Zeitschr. f. Hygiene*, 1894. Vol. XVI, p. 283.

3. *Ibid.*, p. 308.

Mais, d'après MM. R. Pfeiffer et Issaëff, la propriété préventive du sang, à un degré supérieur à celui que possède le sang des individus normaux, est toujours très manifeste pendant la période comprise entre la quatrième et la septième semaine après le début de la maladie. Plus tard elle baisse pour disparaître au bout de trois mois après les premiers signes de la maladie. Cette règle confirme bien la thèse que la propriété préventive du sang ne saurait être considérée comme cause de la cessation du processus cholérique. Si l'on examine un grand nombre de cas, on voit bien que les limites tracées par MM. Pfeiffer et Issaëff sont loin d'être toujours applicables. Ainsi, le sang d'un malade du service de M. le professeur Netter (ce cas est mentionné sous le n° 24 de l'appendice IV de mon premier mémoire), injecté en quantité de 0,25, 0,75, 1 et 1,5 c. c. dans le péritoine de quatre cobayes moyens, ne les a pas empêchés de mourir de péritonite cholérique. Ce sang a été retiré 22 jours après le début de la maladie. En même temps, 0,25 et 0,50 c. c. de sang défibriné d'une femme morte le dixième jour après le début du choléra, ont préservé deux cobayes inoculés avec les mêmes doses de la même culture vibrionienne qui a servi pour la première expérience.

D'un autre côté, je puis citer le cas d'une dame (n° 10 de l'appendice IV de mon premier mémoire) dont le sang fut retiré huit semaines après le début du choléra, c'est-à-dire à une époque encore éloignée des trois mois désignés comme terme de la disparition de la propriété préventive. De sept cobayes qui reçurent dans le péritoine 0,06; 0,12; 0,5; 0,5; 0,75; 1 et 1,5 c. c., le dernier seulement a été préservé contre une dose de vibrions cholériques à laquelle ont résisté, dans la même expérience, deux cobayes qui reçurent 1 et 2 c. c. de sérum sanguin de cobaye normal.

Plus on multiplie les expériences sur la propriété préventive dans le choléra, plus on se persuade de l'impossibilité d'établir des règles bien stables. Des recherches récentes, dont les résultats doivent entrer dans un de mes prochains mémoires, m'ont confirmé dans cette opinion. Mais si je persiste à la maintenir, cela ne tient nullement à ce que je considère ce pouvoir préventif comme quelque chose d'« accidentel », comme me le fait dire à tort et à plusieurs reprises M. Issaëff dans son mémoire

(l. c., pp. 288, 315). La propriété préventive n'est point du tout accidentelle, mais elle est un phénomène très complexe, dont les lois ne peuvent nullement être renfermées dans les limites étroites formulées par MM. Pfeiffer et Issaëff.

L'étude de ce pouvoir préventif, entreprise par plusieurs observateurs, a donné des résultats très intéressants au point de vue de la conception générale de l'immunité des animaux contre la péritonite cholérique.

MM. C. Fränkel et Sobernheim¹ ont observé la transmissibilité de la propriété préventive du sérum sanguin par injections consécutives de cette humeur. Ainsi, un cobaye qui a reçu 2 c. c. de sérum préventif fournit lui-même un sérum préventif, sans être préalablement éprouvé avec des vibrions. La même quantité de sérum (2 c. c.) suffit pour immuniser un cobaye de la troisième génération. Cette propriété se transmet pendant quelque temps, mais finit bientôt par s'épuiser. De ces expériences, leurs auteurs concluent que le sérum exerce son action préventive en stimulant la résistance des éléments cellulaires de l'organisme.

MM. Fränkel et Sobernheim établissent ensuite que la propriété préventive du sérum ne peut être attribuée à son pouvoir bactéricide, parce que, chauffé à 70°, le sérum perd ce dernier, conservant en même temps son pouvoir préventif. Bien plus, ce sérum chauffé amène chez le cobaye non seulement l'établissement de la propriété préventive, mais aussi celui du pouvoir bactéricide, qui doit être considéré par conséquent comme une manifestation spéciale de l'activité cellulaire.

D'après ces observations, l'immunité pour la péritonite cholérique des animaux réside, non dans un pouvoir antitoxique des humeurs, mais bien dans une stimulation des propriétés bactéricides de l'organisme. MM. Fränkel et Sobernheim ne s'expriment pas d'une façon bien nette sur la localisation de ces propriétés, mais du fait que M. Sobernheim a insisté dans un travail antérieur² sur la propriété bactéricide du sérum sanguin, on pourrait conclure que, dans cette conception de l'immunité, il s'agit du pouvoir bactéricide des humeurs et non des cellules.

Tel n'est pas l'avis de MM. R. Pfeiffer et Issaëff. Ce dernier

1. *Hygienische Rundschau*, 1894, n° 3 et 4.

2. *Zeitschr. f. Hygiene*. Vol. XIV, p. 505.

considère comme hors de doute que la propriété bactéricide du sang ne joue pas un rôle important dans l'immunité contre le choléra (*l. c.*, p. 317). Il cite à l'appui le fait que les cobayes, au moment de la plus forte immunité contre le choléra, c'est-à-dire vingt-quatre heures après l'injection des vibrions dans le péritoine, ne manifestent aucune propriété bactéricide spécifique de leur sang. « Dans le sérum d'un tel sang, le vibrion pousse aussi bien que dans le sérum sanguin des cobayes normaux. »

L'organisme, privé de la propriété bactéricide du sang et ne présentant aucun pouvoir antitoxique, est néanmoins très résistant, et cela grâce à l'action phagocytaire des leucocytes.

M. Issaëff a fait une étude très intéressante sur le rôle de ces éléments dans l'immunité naturelle et acquise des cobayes vis-à-vis du vibrion cholérique. Il a constaté que toute une série de substances, telles que la solution physiologique de chlorure de sodium, le bouillon, la nucléine, la tuberculine, l'urine et le sérum des hommes normaux, préservent les cobayes contre l'infection vibrionienne, si cette infection se fait au moment de la plus forte leucocytose provoquée par ces différents liquides. Ainsi, le bouillon, qui est un excellent milieu de culture pour le vibrion cholérique, exerce néanmoins une action immunisante, et ceci grâce à sa propriété d'exciter les leucocytes. Le pouvoir bactéricide principal, celui qui joue le plus grand rôle dans la résistance de l'organisme, réside donc dans les phagocytes.

M. R. Pfeiffer, qui a été témoin de ces expériences, confirme les faits observés par M. Issaëff et accepte « le rôle important des phénomènes phagocytaires dans la résistance » ; mais il fait la restriction suivante : « On ne doit pas confondre — dit-il à la page 282 de son mémoire — cette résistance passagère due à la phagocytose avec la vraie immunité contre le choléra, qui s'accomplit facilement chez les cobayes à l'aide de vaccinations avec des vibrions vivants ou avec les produits de leurs cultures. La vraie immunité contre le choléra n'est point passagère, mais bien durable. » Il paraît que M. Issaëff partage cette manière de voir, comme on peut en juger d'après le paragraphe 6 de ses conclusions (*l. c.*, p. 327). Et cependant, ni M. R. Pfeiffer ni M. Issaëff n'ont fourni aucune preuve de l'importance de leur distinction. Dans les deux catégories de phénomènes (traitement préventif par le bouillon, sérum, etc., d'un côté, et la vaccination

avec les vibrions de l'autre), on observe des phénomènes de leucocytose et de phagocytose tout à fait analogues. Seulement, dans la seconde catégorie, les phénomènes phagocytaires sont plus prononcés. Cette différence s'explique par la stimulation des leucocytes, plus forte avec des produits vibrioniens qu'avec d'autres liquides. D'un autre côté, elle explique la durée plus grande de l'activité phagocytaire à la suite de la vaccination avec des produits vibrioniens. S'il fallait admettre des distinctions essentielles selon la durée de l'état réfractaire, il faudrait accepter des causes différentes pour l'immunité acquise contre le charbon, qui dure une série de mois, et pour l'immunité acquise des animaux contre le pneumocoque, qui ne dure que quelques semaines. Quoique M. Issaëff ajoute que, dans l'immunité des cobayes contre la péritonite cholérique, d'autres facteurs que les phagocytes « contribuent sans aucun doute à la résistance », cependant ses propres recherches ne fournissent aucune preuve en faveur de cette assertion. Il nie l'importance de la propriété bactéricide des humeurs tout aussi bien que celle du pouvoir atténuant et antitoxique du liquide sanguin. On ne se figure même pas quels peuvent être ces facteurs, dont le concours est cependant considéré comme étant hors de doute.

Les belles recherches de M. Issaëff doivent donc être considérées comme un nouvel appui de la théorie des phagocytes. L'application de celle-ci à la péritonite cholérique des cobayes a été assurée par la démonstration que l'exsudat des animaux vaccinés, retiré de l'organisme, fournit une abondante culture de vibrions qui se développent dans l'intérieur des leucocytes morts et envahissent le liquide de l'exsudat. (Voir mon premier mémoire sur le choléra.)

MM. Pfeiffer et Issaëff¹ se sont servi de la vaccination des cobayes contre la péritonite vibrionienne, comme méthode pour différencier le bacille virgule d'autres vibrions analogues.

On sait que plus on a approfondi cette question des caractères spécifiques du vibron cholérique, plus elle est devenue difficile et embrouillée. Tandis qu'à l'époque de la découverte de Koch, la distinction du vibron cholérique semblait chose facile et simple, plus tard, avec le perfectionnement des méthodes, la grande analogie de ce microbe avec beaucoup

1. *Deutsche medic. Wochenschr.*, 1894, n° 43.

d'autres vibrions a amené toutes sortes de complications. M. Koch a tenté de résoudre la question en introduisant la virulence déterminée et la réaction indolnitréuse comme caractères suffisants pour distinguer le vibron cholérique. Mais l'année qui s'est écoulée depuis la publication de M. Koch a apporté toute une série de découvertes qui ont prouvé l'inefficacité des caractères différentiels établis par le grand bactériologiste. C'est pour parer à cet inconvénient que MM. Pfeiffer et Issaëff ont entrepris leurs recherches minutieuses, au sujet desquelles ils n'ont publié qu'une note préliminaire.

D'après ces observateurs, le caractère le plus marqué pour distinguer le vibron cholérique est fourni par la propriété préventive du sérum des animaux vaccinés. Si le sérum, retiré à un animal vacciné contre le bacille virgule, préserve un cobaye neuf contre le vibron mis à l'étude, celui-ci appartient sûrement à l'espèce cholérique. Dans le cas contraire, le vibron en question doit être considéré comme non cholérique. D'un autre côté, l'immunité donnée par le vibron cholérique se maintient vis-à-vis de cette même espèce pendant trois mois et se perd pour les espèces différentes en 10 à 15 jours. Si donc un animal, vacciné trois mois auparavant par le vibron cholérique ou ses produits, résiste à l'injection d'un vibron, celui-ci est le vibron du choléra; si l'animal meurt, le vibron en question doit être exclus de l'espèce cholérigène.

A l'aide de cette méthode, MM. Pfeiffer et Issaëff arrivent à la conclusion suivante : plusieurs vibrions, isolés des déjections cholériques, doivent être considérés, malgré leur grande ressemblance avec le vibron de Koch, comme n'appartenant pas à cette espèce. Ils excluent ainsi de l'espèce cholérigène un vibron qui a été isolé par M. Weichselbaum d'un cas de choléra, et un autre qui a été envoyé à M. R. Pfeiffer par l'Institut Pasteur à Paris.

Comme ce dernier vibron n'est autre que celui qui a été isolé d'un cas de choléra asiatique, à Massaouah, par M. Pasquale, et comme il est le même qui a été désigné comme vibron cholérique par M. R. Pfeiffer dans ses recherches sur le choléra en 1892 (*Zeitschr. f. Hyg.*, t. XI) on voit bien à quels résultats paradoxaux nous amène la méthode nouvelle de l'Institut de Berlin.

Jusqu'à ces derniers temps on se consolait avec cette idée que la difficulté du diagnostic du vibron cholérique ne se présentait

que dans la recherche des vibrions des eaux. C'est ainsi que M. Gruber, dans un article qu'il vient de publier¹, insiste sur la facilité de distinguer le vibron cholérique dans les cas de choléra. Il signale cependant, dans une note ajoutée pendant l'impression, que la trouvaille de M. Ivanoff², faite à l'Institut de M. Koch, complique singulièrement la question. Ils'agit d'un cas de fièvre typhoïde typique, pendant laquelle les déjections liquides étaient remplies d'un vibron tout à fait semblable à celui de Koch. Les quelques différences secondaires, comme la longueur des vibrions et les contours plus irréguliers des colonies sur plaque de gélatine, ont suffi pour permettre de se prononcer nettement contre l'identité du vibron d'Ivanoff avec le vibron cholérique. Mais ici il s'agissait d'une maladie bien distincte du choléra au point de vue clinique, tandis que dans les cas de Massaouah et de M. Weichselbaum, les vibrions, considérés comme différents du bacille virgule, ont été découverts dans des selles de malades atteints du vrai choléra.

On conçoit donc la difficulté qui se présente pour le diagnostic bactériologique de cette maladie. M. Gruber, qui a fait une étude très minutieuse de cette question délicate, arrive à cette conclusion, que le seul caractère vraiment différentiel du vibron cholérique est présenté par l'aspect des toutes jeunes colonies sur des plaques de gélatine à 10 %. Ces colonies doivent toujours avoir des contours irréguliers et présenter une surface couverte de granulations grossières. En dehors du vibron cholérique, il n'y a que le vibron de Deneke qui présente, d'après M. Gruber, les mêmes propriétés que les jeunes cultures du choléra. Or, c'est justement la forme nettement arrondie des colonies toutes jeunes du microbe de Deneke, qui a été, dès le commencement, invoquée comme un des caractères distinctifs entre ce vibron et le vibron cholérique. En réalité, il y a des vibrions de Deneke avec des colonies très jeunes et toutes rondes, et d'autres vibrions de Deneke qui se distinguent par l'irrégularité de leurs contours. Chez le vibron cholérique, il y a des races qui se distinguent par des contours tellement ronds des jeunes colonies, et par une telle absence de granulations qu'on a souvent beaucoup de peine pour les diagnostiquer.

1. *Archiv für Hygiene*, XX, 1894, p. 123.

2. *Zeitschr. f. Hyg.*, t. XV, p. 432.

M. Gruber sent tellement bien toutes les difficultés qu'il déclare (*l. c.*, p. 151) suspectes toutes les indications de ce microbe dans les eaux.

M. Dunbar¹, dans une étude très intéressante sur les vibrions des eaux, arrive à la même conclusion et termine son mémoire en disant qu'il « est encore impossible de donner un jugement définitif sur l'identité supposée de nos vibrions cholériformes des eaux avec les vrais vibrions cholériques ».

Ce court aperçu nous montre jusqu'à quel point ce chapitre sur le diagnostic bactériologique du choléra est encore incertain. Voilà pourquoi nous jugeons indispensable de consacrer une étude spéciale à l'examen des caractères morphologiques et des variations du vibron cholérique.

II

SUR LES VARIÉTÉS ARTIFICIELLES DU VIBRON CHOLÉRIQUE

On sait que M. Cunningham a voulu démontrer l'inexactitude de la théorie du bacille virgule, en admettant qu'il existait chez des cholériques au moins une dizaine d'espèces vibroniennes, presque toutes liquéfiant plus ou moins la gélatine. Or, le choléra asiatique étant une unité morbide incontestable, il est impossible d'admettre qu'elle soit due à plusieurs espèces microbiennes.

Dans le but de se faire un jugement sur ces distinctions, M. Friedrich², à Berlin, a soumis les vibrions de M. Cunningham, ainsi qu'un grand nombre d'autres vibrions cholériques, à une étude comparative détaillée. Il est arrivé à cette conclusion que les prétendues espèces de M. Cunningham ne représentent, dans la grande majorité des cas, que de simples variations de forme du bacille virgule, tel qu'il avait été découvert et décrit par M. Koch. M. Friedrich admet que le vibron cholérique subit, au bout d'une longue période de croissance sur des milieux artificiels, des anomalies de forme. « Mais, — ajoute-t-il, — il ne se produit jamais de changements constants du germe

1. *Arb. a. d. k. Gesundheitsamte*, 1894. Vol. IX, p. 379.

2. *Arbeiten a. d. K. Gesundheitsamte*. Vol. VII, 1892, p. 87.

cholérique; par contre, ces variations de forme subissent souvent des oscillations impossibles à contrôler, et il arrive que ces formes anormales redeviennent de nouveau typiques. On n'a donc aucun droit de parler ni de vraies « variations », ni de phénomènes « d'adaptation des formes » (l. c., p. 432).

Lorsqu'on examine des cultures de vibrions provenant des cholériques ou isolés de différentes eaux, on y trouve deux types assez distincts : d'abord des vibrions courts et recourbés, se rattachant au type du bacille virgule décrit par Koch, et ensuite des filaments longs et minces, tantôt presque droits, tantôt enroulés en spirales à plusieurs tours. Dans son mémoire sur les vibrions des eaux (ces *Annales*, 1893), M. Sanarelli a signalé plusieurs races rentrant dans ces deux types. Le vibron cholérique d'Angers et les vibrions aquatiques de Saint-Cloud et de Gennevilliers rentrent dans la première, le vibron cholérique de Courbevoie et le vibron aquatique de Versailles rentrent dans la seconde catégorie. Parmi les vibrions isolés des déjections cholériques, la plupart se rattachent au type original de Koch; mais le vibron de Paris de 1889, celui de Courbevoie et de Massaouah se distinguent par la finesse et la longueur des filaments. On peut d'autant moins mettre en doute la nature cholérigène de ces longs vibrions, que c'est justement avec l'un d'eux (choléra de Paris, 1884) qu'a été obtenu le cas de choléra expérimental, mentionné plus haut. Le passage par l'organisme humain n'a nullement changé la forme allongée typique du vibron de 1884; le vibron de Courbevoie est aussi resté mince et allongé, malgré le passage par l'intestin de l'homme, dans une expérience relatée dans mon second mémoire.

Voilà pourquoi je ne peux attacher d'importance, comme caractère distinctif, à la longueur du vibron d'Ivanoff¹, isolé dans un cas de fièvre typhoïde. Ce vibron se rattache exactement au type allongé du choléra (Courbevoie, Paris, 1884, etc.), de sorte que, sous ce rapport, on n'a aucun droit de le considérer comme une espèce différente.

Les deux types de vibrions que je viens de signaler présentent une assez grande constance et se conservent, non seulement après le passage à travers l'homme, mais gardent leurs particularités aussi sur toute sorte de milieux nutritifs. On a

1. *Zeitschr. f. Hygiene*. Vol. XV, 1893, p. 434.

essayé plusieurs fois d'établir au moins deux espèces de vibron cholérique, et on pourrait tenter d'élever les vibrions allongés et les virgules courtes au rang d'espèces distinctes, en se basant sur les faits que je viens de citer. Et, cependant, une telle conclusion ne correspondrait point à la réalité.

Les vibrions courts et allongés ne présentent pas deux types constants, mais constituent simplement deux races qui peuvent se transformer l'une dans l'autre, selon les circonstances extérieures. Le moyen le plus facile pour transformer les vibrions du type allongé et mince en une forme courte et recourbée, c'est de les faire passer par les corps des leucocytes. Les vibrions cholériques filamenteux de Courbevoie ou de Massaouah deviennent trapus et raccourcis, si on les inocule à des cobayes vaccinés, et si on fait des cultures sur gélose avec l'exsudat de ces animaux. Le passage à travers le tube digestif des cobayes (non soumis au traitement par la méthode de Koch) sert aussi pour transformer le vibron de Massaouah, un des plus minces, en vibrions se rapprochant du type indien de Koch. Mais ces changements sont, le plus souvent, peu stables.

Les formes courtes se transforment de leur côté en vibrions minces et allongés. On les trouve souvent dans les vieilles cultures sur gélose, à côté des formes rondes bien connues. Mais, transportés dans un nouveau tube de gélose, ces vibrions reprennent leur forme originale et redeviennent courts et trapus.

Pour obtenir des changements durables, il faut que les vibrions soient soumis à des influences particulières agissant lentement, pendant un temps suffisamment long. Je choisirai, comme exemple particulier, la transformation du vibron d'Angers.

D'abord, quelques mots sur l'origine de ce vibron. En juin 1893, j'ai reçu un échantillon de matières fécales d'un Américain, arrivé de Nantes à Angers et atteint de choléra. Le cas était tout à fait typique au point de vue clinique, et reconnu par M. le Dr Bahuaud, qui soigna le malade, comme choléra asiatique. La maladie était très grave, mais le malade a fini par se rétablir complètement. Ce cas importé est resté isolé à Angers, et il ne s'est pas produit d'épidémie.

Ensemencées dans l'eau peptonisée et gélatinisée, les déjections ont donné une culture très riche de vibron cholérique des

plus typiques. Comme forme, celui-ci appartient à la variété courte, trapue et recourbée en virgule, et se rattache au type original de Koch, ainsi qu'au plus grand nombre des vibrions cholériques connus. Cette particularité a déjà été signalée par M. Sanarelli (ces *Annales*, 1893, p. 726 et pl. XIII, B), qui a donné quelques détails sur ce vibron d'Angers. Je renvoie le lecteur à son mémoire pour ce qui concerne la liquéfaction de la gélatine, la réaction indolnitreuse, etc. M. Sanarelli a mentionné la grande virulence de ce vibron. Cette propriété est, en effet, très remarquable, et le microbe d'Angers est le plus virulent de tous les vibrions cholériques que je connais. Un centième d'une culture (développée pendant 17 heures sur la surface de la gélose inclinée, dans un tube de 1,5 centimètres de diamètre et de 12 centimètres de longueur), injecté dans la cavité péritonéale, suffit pour tuer un cobaye adulte en moins de 24 heures. Les vibrions se généralisent dans le sang, avec lequel on obtient une culture pure de ces microbes. Une demi-culture, injectée sous la peau du cobaye, est également mortelle, tandis qu'un quart de culture n'a pas suffi, dans ces conditions, pour tuer un cobaye de 272 grammes. Le vibron d'Angers est très pathogène pour le lapin et le pigeon.

Cette virulence exagérée ne s'est maintenue que pendant quelque temps. Examinée plus tard, elle s'est montrée très atténuée. Ainsi une épreuve, faite 113 jours après l'isolement du vibron, a démontré que même un quart de culture récente sur gélose ne suffit pas pour tuer tous les cobayes inoculés dans le péritoine. Malgré un certain renforcement par passage à travers des cobayes, le vibron n'était plus capable de tuer des pigeons par inoculation dans le muscle pectoral. Une autre épreuve, faite 242 jours après l'isolement du vibron, a montré que trois quarts d'une culture sur gélose, âgée de 25 heures, inoculés dans le péritoine d'un cobaye de 310 grammes, étaient insuffisants pour donner la maladie mortelle.

Cet exemple montre une fois de plus que la virulence du vibron cholérique est une des propriétés les moins stables. En 8 mois le vibron d'Angers, le plus virulent de tous ses congénères, est retombé à une virulence moindre que la moyenne. On voit bien jusqu'à quel point il est injuste de choisir cette propriété comme caractère différentiel du microbe cholérique.

Malgré ce changement si considérable de ses propriétés pathogènes, le microbe s'est conservé pendant tout le temps indiqué sous le même aspect morphologique de vibron court et recourbé en virgule. Même l'influence des antiseptiques était impuissante pour le modifier sous ce rapport. Mais lorsque le vibron d'Angers a été cultivé pendant longtemps dans de l'eau peptonisée à 1 0/0 et mis à l'étuve à 36°, au fur et à mesure que le liquide s'évaporait, la forme devenait de plus en plus mince et allongée. Lorsque le tube ne renferme que peu de liquide (5 à 6 c.c.), au bout de 25 jours, les vibrions ont déjà tellement modifié leur forme que, réensemencés sur la gélose, une grande partie présente l'aspect allongé et filiforme, tandis qu'un certain nombre de microbes conservent encore leur forme primitive de courtes virgules recourbées. On croirait d'abord à un mélange de culture de deux espèces différentes. Un ensemencement sur gélose, fait 43 jours après que la culture avait été préparée dans de l'eau peptonisée et abandonnée à 36°, a donné naissance à une culture composée presque exclusivement de filaments de longueur moyenne. Le vibron d'Angers, si caractéristique par sa forme courte et recourbée de virgule, s'est transformé en un type nouveau, se rapprochant tellement du vibron d'Ivanoff qu'on pourrait facilement les confondre. Au bout d'un mois et demi de séjour à l'étuve, dans le liquide devenu plus concentré qu'au début, il s'est produit une variété stable, rentrant tout à fait dans la catégorie des vibrions cholériques de Courbevoie, de Massaouah et de Paris, 1884. Dans des tubes qui renfermaient 10 c. c. et plus d'eau peptonisée, la même transformation s'est opérée dans un espace de temps plus long. Au bout de cette métamorphose, j'ai obtenu deux races du vibron d'Angers très stables et en même temps très distinctes. On n'a qu'à jeter un coup d'œil sur les deux photographies de la planche X, pour s'assurer de la grande différence de la race primitive représentée par la fig. 1, faite d'après un 33^e passage sur gélose, et de la race artificielle, représentée sur la figure 2, faite d'après une culture sur gélose du 34^e passage.

Les deux races peuvent être semées sur la même plaque de gélose, où elles se développent également bien, mais où on peut les distinguer par la forme différente des vibrions. Même, semées sur d'autres milieux nutritifs, liquides et solides, les deux races conservent leurs particularités. Sur pomme de terre

acide, le vibron d'Angers pousse assez bien à l'étuve, mais donne facilement des formes d'involution. Eh bien, ces formes anormales sont bien différentes dans les deux races. La race primitive produit dans ces conditions des corps gonflés en tonneau, courts et trapus, tandis que la race artificielle donne naissance à des cordons spirales de dimension extraordinaire. Sur gélose ordinaire, aussi bien que sur gélose glycinée, en gélose sans viande (Sanarelli), en bouillon, dans de l'eau peptonisée à 1 0/0, dans ce liquide additionné de gélatine à 2 0/0, dans la gélatine ordinaire, partout les deux races se distinguent facilement l'une de l'autre. Sur des plaques de gélatine, les colonies de la race artificielle présentent une analogie frappante avec les colonies du vibron d'Ivanoff; dans les deux cas, les contours sont beaucoup plus sinueux et irréguliers que d'habitude, ce qui tient probablement à la longueur démesurée des vibrions.

La virulence de la race artificielle s'est présentée comme au-dessous de la moyenne, comme celle de la race primitive à la même époque. Dans la cavité péritonéale du cobaye sensible, la race allongée a conservé sa forme, et les cultures, obtenues avec l'exsudat, ont manifesté également les particularités de la race artificielle.

Ces faits prouvent d'un côté une constance remarquable des caractères du vibron acquis sous l'influence du changement des agents extérieurs; de l'autre côté, ils démontrent la grande variabilité du vibron cholérique.

Lorsque j'ai soumis le vibron, isolé par M. Mosny dans un cas de choléra à Brest et obligeamment mis par lui à ma disposition, aux mêmes influences que le vibron d'Angers, je n'ai pas obtenu les mêmes changements qu'avec ce dernier. Peut-être serais-je arrivé à un meilleur résultat en prolongeant le temps de l'expérience? On sera peut-être tenté d'attribuer cette stabilité à la circonstance que le vibron de Brest était d'une date beaucoup plus récente que le microbe d'Angers. Mais un vibron du choléra de Cassino, également récent, que je dois à l'obligeance de M. Sanarelli, à Rome, s'est montré particulièrement polymorphe. Dans l'exsudat péritonéal des cobayes, auxquels il donnait la mort, ce vibron se présentait sous des formes tellement différentes qu'on pouvait supposer un mélange de cultures. Les formes prédominantes et les plus remarquables présentaient

une ressemblance frappante avec les zoospermes des animaux : les vibriions étaient munis d'une tête grosse et ovale et d'une queue longue et très mince. Cette forme bizarre s'est maintenue pendant quelques générations : mais, à la suite de nombreux passages et de cultures renouvelées sur gélose ordinaire, les vibriions se sont transformés en un type uniforme de virgules minces et petites.

D'après tout cet ensemble de faits, il est donc impossible de nier que le vibriion cholérique pourrait être cité comme un exemple frappant du pléomorphisme, si répandu dans le monde des bactéries. Lorsqu'on discutait cette question si controversée, on insistait souvent sur la distinction qu'il fallait faire entre la variation des formes et la variation des espèces. Plusieurs bactériologistes distingués soutenaient que le pléomorphisme n'impliquait nullement le changement des espèces, et que chez les bactéries l'espèce était tout aussi nettement délimitée que dans la majorité des plantes et des animaux. Il faut reconnaître que les acquisitions de ces dernières années ont fortement ébranlé cette manière de voir. Il est évident qu'on ne peut plus penser, comme Naegeli, que toutes les bactéries ne présentent qu'un mélange bigarré de formes appartenant à une seule et même espèce. On ne peut même pas admettre l'ancienne opinion de M. Zopf, qui réunissait toutes les bactéries en un seul genre *bacterium*. Mais, d'un autre côté, il est incontestable que plus on approfondit l'étude des formes bactériennes, plus il devient difficile de les séparer en espèces bien distinctes : au lieu de celles-ci, on trouve des groupes plus ou moins vastes. Même les bactéries aussi caractéristiques que le bacille charbonneux ou le bacille de la tuberculose ne peuvent être nettement délimitées. Les formes atténuées du premier se confondent avec les bacilles inoffensifs du sol, tandis que le bacille de la tuberculose se sépare en deux catégories (bacille de la tuberculose humaine et aviaire), sans qu'on sache si celles-ci correspondent à des variétés ou des espèces. On peut donc admettre en général que s'il existe des espèces dans le groupe des bactéries, elles ne correspondent pas à des « bona species » en botanique et en zoologie, mais à de mauvaises espèces, comme le *Planorbis multiformis* de Hilgendorf et d'autres encore.

Il n'est point étonnant que dans ces conditions le diagnostic

bactériologique puisse présenter des difficultés presque insurmontables. Appliquées au cas particulier qui nous intéresse, le choléra, les données que nous avons réunies ne nous permettent pas de nous associer à plusieurs des opinions relatées dans notre premier chapitre. Comme les caractères essentiels du vibron cholérique, tels que la forme, virulence, etc., sont extrêmement variables, il devient impossible de s'arrêter sur des qualités tout à fait secondaires, comme la durée de l'état réfractaire, ou la protection exercée par le sang d'un animal vacciné. Les propriétés des jeunes colonies sur plaques de gélatine ne peuvent présenter non plus le caractère de stabilité nécessaire pour la différenciation des espèces.

D'un autre côté la notion de la variabilité permet de résoudre certaines questions qui ne trouvent pas de solution sans elle. Pour citer un exemple, je me rapporterai au cas relaté dans le dernier mémoire de M. Gruber. Une personne arrivée de Trieste (où régnait alors — en 1886 — une épidémie de choléra asiatique) à Cilli tombe malade avec des manifestations cholériques. Hoffman-Wellenhof isole des déjections un vibron qui se distingue du vibron cholérique par la longueur des filaments, persistante dans les cultures sur tous les milieux. M. Gruber considère ce type comme « sans aucun doute, identique avec le vibron Ivanoff », et laisse indécis si ces deux formes doivent être considérées comme des vibrions cholériques. Pour moi il n'y a absolument aucune raison de le nier. Les particularités morphologiques du vibron de Cilli sont communes avec celles de la race artificielle du vibron d'Angers, incontestablement cholérique. La circonstance que la forme allongée du vibron de Cilli s'est manifestée dès le début, tandis que la race d'Angers a été obtenue au bout d'une longue période, ne modifie nullement cette appréciation, surtout si l'on se souvient que les vibrions de Courbevoie et de Paris 1884 ont conservé leur forme mince et filamenteuse dans les déjections humaines.

Je ne m'arrête nullement devant la conséquence que le vibron d'Ivanoff doit être considéré aussi comme vibron cholérique. On a constaté à plusieurs reprises que des individus, dont les déjections renferment une grande quantité de vibrions cholériques incontestables, peuvent ne pas avoir le choléra. On ne conçoit pas pourquoi cette immunité ne pourrait point être

associée à la sensibilité envers la fièvre typhoïde. Grâce à l'obligeance de MM. Issaëff et Ivanoff, j'ai pu examiner en détail le vibrion d'Ivanoff, et je n'hésite pas de le ranger dans le groupe du vibrion cholérique. Cette admission est d'autant plus permise que la découverte de M. Ivanoff a été faite à Berlin à une époque où il se trouvait quelques cas suspects de choléra. Et cependant nous savons bien que le microbe cholérique peut se trouver à une période et dans des localités indemnes du choléra.

Parmi les vibrions des eaux qui liquéfient la gélatine et qui ont été découverts en dehors de toute épidémie cholérique, il se trouve sûrement des vibrions du vrai choléra. Je l'affirme pour certains vibrions découverts dans l'eau de la Seine, printemps et été 1893 (à une époque où il n'y avait pas de choléra), et décrits dans les mémoires de MM. Blachstein et Sanarelli (ces *Annales*, 1893, p. 689 et 693). Un de ces vibrions a même été trouvé dans l'eau de Seine qui alimentait Versailles, ville indemne vis-à-vis du choléra. Ce vibrion se rattache de très près au type des vibrions allongés, tels que les vibrions de Courbevoie, Massouah, etc., tandis qu'un second vibrion cholérique de la Seine, désigné par M. Sanarelli comme vibrion de Saint-Cloud, appartient au type des vibrions courts, en virgules.

Guidé par ces faits, je suppose que le vibrion de l'Elbe décrit par M. Dunbar, et sur la signification duquel il n'a pas pu se prononcer (voir la fin du premier chapitre de ce mémoire), doit être considéré également comme vibrion cholérique.

S'il faut admettre ainsi que le vibrion cholérique peut circuler dans les eaux, sans amener le choléra, et peut pulluler dans le canal intestinal de l'homme, sans que celui-ci manifeste des symptômes cholériques, il faut accepter aussi que, pour provoquer la maladie, le microbe spécifique doit se trouver dans des conditions particulièrement favorables. C'est une conclusion sur laquelle je reviendrai dans un prochain mémoire.

Fig. 1



Fig. 2



CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU VENIN DES SERPENTS

IMMUNISATION DES ANIMAUX ET TRAITEMENT DE L'ENVENIMATION

PAR LE Dr A. CALMETTE

Médecin de première classe des colonies.

(Travail du Laboratoire de M. Roux, à l'Institut Pasteur.)

I

J'ai exposé, dans un précédent mémoire¹, quelques résultats des recherches que j'ai effectuées à Saïgon sur le venin de *naja tripudians* ou *cobra capel*. Depuis cette publication, j'ai poursuivi l'étude des venins à l'Institut Pasteur, et c'est grâce à l'obligeance et aux conseils de M. Roux que j'ai pu fixer les bases d'une méthode à la fois préventive et thérapeutique de l'envenimation, qui donne des résultats excellents chez les animaux, et dont l'application à l'homme s'impose désormais.

J'ai pu expérimenter simultanément le venin de quatre espèces différentes de serpents : *naja tripudians*, de l'Inde et de l'Indo-Chine ; *hoplocephalus curtis* et *pseudechis porphyriacus* (serpent tigré et serpent noir) d'Australie ; vipère *pelias berus* de France.

La plus grande partie de mon venin de *naja* provient de Saïgon et m'a été fournie par vingt-six najas vivants auxquels j'ai enlevé les glandes à venin. Une partie du liquide obtenu par expression de ces glandes a été desséchée dans le vide. J'ai dilué le reste dans cinq fois son poids de glycérine pure à 30°. Ces deux lots de venin ont été enfermés aussitôt dans des tubes scellés.

L'activité de celui qui était dissous dans la glycérine est restée exactement la même depuis un an ; elle tue le lapin à une dose qui représente 0^{mgr},25 de venin sec frais par kilogramme d'animal, tandis que le venin conservé à l'état sec depuis la même époque ne tue qu'à la dose de 0^{mgr},80 par kilogramme².

1. Ces *Annales*, mars 1892.

2. Je dois à l'obligeance de M. le professeur Raphaël Blanchard un échantillon plus ancien de venin sec de cobra qu'il tenait lui-même de M. le professeur A. Gautier. Ce venin, recueilli depuis plusieurs années, n'est plus toxique pour le lapin qu'à la dose de 4^{mgr},30 par kilogramme d'animal ; son activité est donc à peu près cinq fois moindre que celle de mon venin de Saïgon.

Le tableau suivant indique la toxicité relative, pour 1 kilogr. de lapin, des venins de différentes origines que j'ai expérimentés. J'emploie, pour désigner cette toxicité, une notation semblable à celle que MM. Behring, Roux et Vaillard ont adoptée pour la toxine tétanique, et qui est basée sur le nombre de grammes d'animal tué par 1 gramme de toxine.

1 ^o Venin de <i>naja</i>	0 ^m gr,25	par kilogramme de lapin.	
1 gr. de ce venin tue	4,000	kilogrammes de lapin; il a donc une	
activité de.....			4.000.000
2 ^o Venin d' <i>hoplocephalus</i> ¹.....	0 ^m gr,29	activité	3.450.000
3 ^o — de <i>pseudechis</i>	4 ^m gr,25	»	800.000
4 ^o — de vipère <i>pelias berus</i>	4 ^m gr »	»	250.000

Bien entendu, cette évaluation du pouvoir toxique n'a rien d'absolu et elle varie considérablement suivant l'espèce animale sur laquelle on expérimente. Ainsi, le cobaye et, plus encore, le rat présentent une sensibilité extrême à cet égard. Il suffit, par exemple, de 0^mgr,45 de venin de vipère pour tuer, en moins de douze heures, 500 grammes de cobaye. L'activité de ce venin vis-à-vis du cobaye est donc de 3,333,000, alors que, pour le lapin, elle n'est que de 250,000.

Le contraire se produit pour les espèces animales plus résistantes, telles que le chien. Il faut environ 40 milligrammes de venin de cobra pour tuer un chien de 6^k,500, tandis que pour tuer le même poids de lapin, il suffit de 4^mgr,65. L'activité toxique de ce venin qui, pour le lapin, est de 4,000,000, n'est donc plus que de 650,000 à l'égard du chien.

II

ACTION DE LA CHALEUR ET DES DIVERSES SUBSTANCES CHIMIQUES SUR LES VENINS

J'ai étudié séparément, sur chacun des venins que je viens d'énumérer, l'action de la chaleur et de diverses substances chimiques. Il n'existe pas entre eux de différences capitales : tous sont détruits ou modifiés par les mêmes réactifs, et tous

1. J'ai eu à ma disposition deux spécimens de ce venin : l'un a été adressé à M. Roux par M. Mac Garvie Smith, de Sidney, ainsi que le venin de *pseudechis*; l'autre m'a été remis obligeamment par M. le professeur Dastre, de la Sorbonne, et provient de la même origine.

perdent leur toxicité par le chauffage plus ou moins prolongé aux environs de 100°.

Le venin de cobra capel perd sa virulence exactement à partir de 98° après vingt minutes. Le venin d'hoplocephalus est un peu plus résistant; si on le chauffe, même pendant dix minutes, entre 100 et 102°, il est encore toxique et ne devient inoffensif que lorsque cette température est maintenue pendant quinze minutes au moins. Celui de pseudechis est détruit entre 99 et 100°; celui de vipère, entre 95 et 97°. La dose de ces venins chauffés, injectée aux animaux, était toujours de 1 milligramme pour ceux de cobra et d'hoplocephalus, de 4 milligrammes pour celui de pseudechis, et de 10 milligrammes pour celui de vipère.

Ces écarts, assez faibles pour des venins en solutions concentrées, deviennent plus considérables si l'on opère le chauffage sur des solutions très diluées. Ainsi, 1 milligramme de venin de cobra, dilué au 1 10,000 et chauffé au bain-marie, en tube scellé, à 90° pendant dix minutes, devient inoffensif pour le lapin. En dilution à 1/100, la même dose qui a subi l'action de la chaleur pendant le même temps tue seulement avec un léger retard, mais elle ne produit, au point d'inoculation, ni l'œdème, ni les hémorragies capillaires que l'on observe toujours à la suite des injections de venin non chauffé.

Le venin de vipère, chauffé dix minutes à 80°, comme l'ont montré MM. Phisalix et Bertrand, ne développe également plus d'œdème, quel que soit son degré de dilution, et pour tuer le lapin il faut en injecter au moins 6 milligrammes ou 0^{mgr},4 au cobaye.

Le chauffage fait donc perdre aux venins leurs propriétés phlogogènes et une partie de leur pouvoir toxique: mais, pour des doses massives, trois ou quatre fois supérieures à la dose mortelle, ce pouvoir toxique n'est entièrement détruit qu'à des températures voisines de l'ébullition.

La soude et la potasse en solution à 1 10 diminuent beaucoup la toxicité des venins. Lorsque le contact est prolongé pendant cinq ou dix minutes, elles les détruisent même tout à fait, mais elles n'ont plus aucune action si l'on fait agir ces alcalis en solutions plus étendues, ou si on les mélange à du venin préalablement dilué.

Injectée dans les tissus autour du point d'inoculation, une solution de soude à 1 100 n'empêche pas l'intoxication et elle produit des douleurs extrêmement vives.

L'eau oxygénée, l'acide phosphorique, l'acide sulfhydrique et l'acide chlorhydrique n'ont aucune action *in vitro*.

Il en est de même du carbonate de soude et du carbonate d'ammoniaque en solutions à 1/10, même lorsqu'on mélange 100 parties de ces sels à une partie de venin. Le phosphate d'ammoniaque et le sulfate d'ammoniaque forment un précipité albumineux blanc qui est toxique.

Le persulfate d'ammoniaque ne forme pas de précipité, et le mélange de 1 partie de venin avec 20 parties d'une solution à 1/10 de ce sel ne tue plus. Mais les injections de persulfate d'ammoniaque dans les tissus sont impuissantes à empêcher l'absorption du venin inoculé.

L'eau iodée, la solution de Gram et le trichlorure d'iode à 1/1000 donnent un précipité brun également toxique. 1 milligramme de venin de cobra mélangé à 2 c. c. de solution de Gram tue le lapin dans le même délai que le venin pur.

L'eau bromée mélangée au venin détruit son pouvoir toxique ; injectée dans les tissus, même dix minutes après l'inoculation, elle empêche encore l'envenimation, mais, au delà de ce délai, elle est inefficace.

On peut injecter l'eau bromée diluée au 1/3 sans produire d'abcès ni d'escharres, mais ces injections sont très douloureuses.

L'hypobromite de soude n'a aucune action modificatrice.

L'eau chlorée offre les mêmes propriétés et les mêmes inconvénients que l'eau bromée.

Les *hypochlorites alcalins* donnent des résultats bien supérieurs à ceux de toutes les substances signalées jusqu'ici comme antidotes du venin : il suffit de 3 gouttes d'une solution à 1/12 de chlorure de chaux solide ou d'hypochlorite de soude pour détruire immédiatement, *in vitro*, l'activité de 1 milligramme de venin de cobra ou de 10 milligrammes de venin de vipère dissous dans 1 c. c. d'eau.

On peut injecter de grandes quantités de ces hypochlorites dilués dans les tissus, dans les séreuses et même dans les veines sans provoquer aucun accident. Ils sont encore très efficaces lorsqu'on les injecte au bout d'un temps relativement très long après l'inoculation venimeuse, et à une grande distance du point inoculé.

Les hypochlorites de soude et de potasse, toujours fortement

alcalins, ont l'inconvénient d'occasionner d'assez vives douleurs, surtout si on emploie des solutions ordinaires du commerce, dont la teneur en chlore varie de 11 à 15 litres par 1,000 c. c.

Le chlorure de chaux solide, purifié, est d'un emploi plus commode; grâce à sa faible alcalinité, il n'irrite pas les tissus et ne provoque aucune souffrance chez les animaux.

Je me suis servi, dans la plupart de mes expériences, de solutions de chlorure de chaux au 1/12, titrant 4^l, 232 de chlore par 1,000 c. c., et que je diluais, au moment de l'usage, dans 3 ou 5 parties d'eau; je ramenaïs ainsi la dilution à injecter au titre de 1^l, 410 ou 0^l, 846 de chlore par 1,000 c. c. On peut, dans ces conditions, en injecter de 10 à 30 c. c. aux lapins sous la peau ou dans le péritoine sans avoir à redouter aucun accident.

L'injection intraveineuse de cette même quantité d'hypochlorite est également bien supportée, mais elle ne réussit presque jamais à empêcher l'envenimation, tandis que l'injection sous-cutanée se montre toujours très efficace.

Chez les animaux inoculés avec une dose de venin mortelle en moins de 2 heures, on peut sûrement empêcher la mort en injectant la solution d'hypochlorite de chaux dans les 20 premières minutes après l'inoculation venimeuse. L'injection doit être faite, bien entendu, en pigures disséminées autour du lieu d'inoculation, et en divers points du corps de l'animal.

Au delà de 20 minutes et jusqu'à une demi-heure, l'intervention est encore très souvent suivie de guérison. Passé ce délai, si on prend soin de soutenir l'énergie cardiaque avec une dose faible de morphine injectée sous la peau (1 centigramme par exemple pour le lapin), les phénomènes asphyxiques peuvent être retardés et permettre à l'hypochlorite d'exercer son action. J'ai traité ainsi des animaux avec succès 50 minutes après l'injection d'une dose de venin capable de les tuer en 1 heure et demie environ.

MM. Roux et Vaillard ont déjà observé les mêmes effets des hypochlorites alcalins à l'égard de la toxine tétanique, non seulement *in vitro*, mais même dans l'organisme des animaux inoculés avec des doses mortelles de cette toxine, et qui ont guéri à la suite d'injections répétées d'hypochlorites de soude ou de chaux.

Le chlorure d'or en solution au 1/100, que mes expériences

antérieures m'avaient conduit à recommander pour le traitement des personnes mordues, agit *in vitro* avec autant d'énergie que les hypochlorites, mais son action s'épuise beaucoup plus vite dans les tissus, et il ne permet d'arrêter l'envenimation que si on l'injecte peu d'instants (10 minutes environ pour le lapin) après l'inoculation du venin.

Le chlorure double d'or et de sodium et le chlorure de platine ne détruisent que très lentement les propriétés toxiques du venin. Le phosphate d'or ne les détruit pas du tout.

Le chlorure de platine, comme le chlorure d'or, forme avec le venin, désalbuminé par le chauffage pendant 15 minutes à 88°, un précipité brun clair, gélatineux, noircissant à la lumière. Ce précipité reste toxique pendant plus d'une heure au contact d'un excès de sel de platine. Peu à peu il devient ensuite inactif.

Si, sur un mélange toxique de 1 partie de venin désalbuminé par le chauffage, et de 10 parties de chlorure de platine, on fait agir immédiatement un courant d'hydrogène sulfuré, on trouve que ni le précipité de sulfure de platine, ni le liquide incolore que l'on en sépare par filtration n'ont de propriétés toxiques.

L'hydrogène sulfuré n'exerçant aucune action sur le venin, il faut donc admettre que celui-ci est détruit ou modifié par les composés chlorés qui se forment pendant la précipitation du platine à l'état de sulfure.

Il serait important de savoir par quel mécanisme les composés chlorés (hypochlorites, chlorure d'or) et l'eau bromée modifient les venins, ou s'ils les rendent inoffensifs par suite de leur propre effet sur le sang ou sur les cellules vivantes.

Mais la chimie du sang et celle des venins sont encore trop à l'état embryonnaire pour permettre dès maintenant une réponse à cette question. Nous allons voir toutefois que la seconde hypothèse puise une grande vraisemblance dans les faits que je vais exposer.

III

IMMUNISATION DES ANIMAUX CONTRE LE VENIN

Dans une communication à la Société de biologie (10 février 1894), j'ai mentionné les procédés à l'aide desquels on

peut donner aux animaux l'immunité contre l'envenimation, et j'ai montré qu'un animal immunisé contre l'un des venins que j'ai expérimentés, celui de cobra, par exemple, l'est aussi contre celui de vipère ou d'*hoplocephalus*, et réciproquement.

De leur côté, MM. Phisalix et Bertrand annonçaient (*Acad. des Sciences*, 5 février, et *Société de biologie*, 10 février 1894) qu'ils avaient réussi à donner au cobaye l'immunité contre le venin de vipère au moyen d'inoculations préventives de ce même venin chauffé à 80° au bain-marie pendant 5 minutes.

On peut donc rendre les animaux réfractaires à l'inoculation d'une dose mortelle de venin, soit par l'accoutumance à des doses faibles répétées, soit par le mélange d'hypochlorites alcalins ou de chlorure d'or avec le venin, soit par le venin modifié par la chaleur.

La première méthode réussit à donner une immunité très solide contre des doses considérables de poison, mais elle est lente et d'une application qui demande à être très surveillée. Si on injecte aux animaux des doses croissantes trop rapprochées, ils ne tardent pas à maigrir et succombent.

Le moyen le plus sûr d'éviter tout accident consiste à inoculer d'abord une quantité de venin égale à la moitié de la dose mortelle minima, 0^{mgr},25 de venin de cobra, par exemple, pour un lapin de 2 kilogrammes, et à laisser reposer l'animal pendant 12 à 15 jours. Si, après ce délai, il a repris son poids primitif, on renouvelle la même injection. Au bout de 6 jours, on peut injecter impunément 0^{mgr},50, dose mortelle pour un lapin neuf de même poids.

Six jours après, l'animal peut recevoir 0^{mgr},75 de venin, puis 1 milligramme. A partir de ce chiffre, on peut sans inconvénient augmenter chaque fois de 1 milligramme la quantité de venin, et en 2 mois on arrive à faire tolérer très facilement la dose énorme de 6 milligrammes injectée d'un seul coup, dose capable de tuer 24 kilogrammes de lapin.

On peut produire aussi sûrement l'accoutumance en injectant tous les 2 jours à des lapins, pendant 2 semaines, une dose très faible de poison, 1/16 milligramme de venin de cobra par exemple, puis ensuite des doses de plus en plus fortes ; ou, mieux encore, en insérant à demeure, sous la peau, un petit bâton de

craie imprégné de 4 ou 5 milligrammes de venin et entouré de collodion.

Cet expédient, dont je dois l'idée à M. Roux, permet de créer dans l'organisme de l'animal une sorte de glande artificielle, d'où le venin diffuse lentement et d'une manière continue, à travers la couche de collodion formant membrane dialysante.

Au bout d'un mois environ, l'immunité est assez solide pour permettre à l'animal de supporter sans malaise l'inoculation d'épreuve d'une dose mortelle.

La méthode d'immunisation par le venin modifié par la chaleur est beaucoup plus rapide, puisqu'elle permet en 48 heures de rendre un cobaye réfractaire à une dose mortelle, mais elle ne permet de vacciner ces animaux que contre une quantité de poison voisine de la dose minima mortelle.

En inoculant à des cobayes, tous les 3 jours, des doses croissantes de venin de vipère chauffé pendant 10 minutes à 80°, je n'ai pas obtenu de tolérance au delà de 0^{mgr},6 pour ce venin chauffé.

Chez le lapin, la limite de la tolérance, dans les mêmes conditions, s'élève à 10 milligrammes; lorsqu'on dépasse cette dose, l'animal maigrit brusquement et meurt en 2 ou 3 jours.

L'accoutumance à la toxicité pourtant affaiblie du venin chauffé ne se produit donc pas lorsqu'on renouvelle les injections à des intervalles si rapprochés.

On peut la réaliser, au contraire, exactement comme pour le venin non chauffé, en prenant soin de les espacer davantage, et on arrive alors facilement, en 25 jours, à faire tolérer au lapin 14 milligrammes de venin chauffé, puis 8 milligrammes de venin entier, et au cobaye 1 milligramme de venin chauffé, puis 0^{mgr},6 de venin entier.

Dans ces conditions, on retombe dans le procédé d'immunisation lente par l'accoutumance, et on arrive toujours à constater que les animaux ne supportent jamais d'emblée une dose de venin entier égale à la dose de venin chauffé qu'ils ont reçue 3 jours auparavant.

Il est beaucoup plus facile et expéditif d'immuniser les animaux, en employant une méthode analogue à celle que MM. Roux et Vaillard ont utilisée pour produire l'état réfractaire au tétanos.

En injectant successivement à des lapins, sous la peau, à

des intervalles réguliers de 5 jours, une dose de 2 milligrammes de venin de cobra mélangée à une solution très étendue (1 60) d'hypochlorite de soude ou de chaux, en quantité décroissante, on obtient sûrement, au bout d'un mois, l'immunisation contre cette dose de 2 milligrammes de venin pur. On peut ensuite, sans aucun danger pour l'animal, renforcer son immunité par des injections progressives de venin répétées tous les 8 ou 10 jours, en augmentant chaque fois de 1 ou même de 2 milligrammes la quantité de venin injectée.

L'immunité contre une dose de venin simplement mortelle pour les animaux neufs peut s'obtenir encore de la manière suivante : si on inocule, sous la peau d'un lapin, 2 milligrammes de venin de cobra, dose capable de tuer en moins de 2 heures, et si, 20 minutes après, on traite l'animal par des injections thérapeutiques de chlorure de chaux dilué à 1 60, autour de l'inoculation venimeuse et en divers points du corps, le lapin ainsi traité résiste, après un malaise passager. Il maigrit d'abord pendant 6 à 8 jours, puis se rétablit complètement.

Si, après 2 semaines de repos, on l'éprouve par 1/2 milligramme de venin, il ne succombe pas. Ce lapin est dès lors vacciné pour cette dose de 1/2 milligramme, qui tue en 8 à 12 heures tous les témoins.

Pour que l'immunisation soit réalisée par cette méthode, il est tout à fait nécessaire que l'animal ait subi, entre l'inoculation venimeuse et le traitement, un commencement de malaise. Si le traitement suit de trop près l'introduction du venin, il n'y a pas d'immunité produite.

Le même résultat peut être atteint sans traitement consécutif, en se bornant à injecter, en une seule fois, une petite quantité de venin pur égale à la moitié de la dose capable de tuer en 12 heures un animal neuf. 2 semaines après, l'inoculation d'épreuve de la dose minima mortelle est supportée sans malaise.

Enfin, et j'insisterai tout à l'heure sur ce fait particulièrement intéressant, il n'est pas indispensable de recourir au venin lui-même, modifié ou non par la chaleur ou par des substances chimiques, pour conférer l'immunité. Certaines substances, telles que l'hypochlorite de soude et le chlorure de chaux, *sans mélange de venin*, injectées en petites quantités pendant 4 à 5 jours de suite sous la peau des lapins, produisent d'emblée l'état

réfractaire. Les animaux ainsi traités peuvent, après 6 jours, supporter une dose mortelle.

Les divers procédés que je viens d'exposer m'ont servi à immuniser des lapins, des cobayes et un chien. En opérant avec précautions et en pesant régulièrement les animaux afin de laisser reposer ceux qui maigrissent, il est facile d'arriver à leur faire supporter des quantités véritablement colossales de venin pur. Je conserve depuis 8 mois des lapins qui ont reçu chacun de 30 à 35 milligrammes de venin de cobra et qui sont en parfaite santé.

IV

PROPRIÉTÉS DU SÉRUM DES ANIMAUX IMMUNISÉS

Le sérum des animaux immunisés contre les venins par l'une quelconque des méthodes précédentes, possède des propriétés semblables à celles que MM. Behring et Kitasato, Roux et Vaillard ont constatées pour le sérum des animaux immunisés contre le tétanos et la diphtérie.

Ce fait, que j'ai déjà mentionné à la Société de Biologie (10 février 1894), a été observé en même temps par MM. Phisalix et Bertrand sur les cobayes vaccinés contre le venin de vipère par le procédé que ces expérimentateurs ont décrit.

Si on mélange *in vitro* 1 milligramme de venin de cobra ou 4 milligrammes de venin de vipère à une petite quantité de sérum d'un lapin immunisé, et qu'on inocule ce mélange à un lapin neuf, celui-ci ne présente, dans la suite, aucun malaise.

Il n'est même pas nécessaire que le sérum provienne d'un animal vacciné contre un venin de même origine que celui qu'on introduit dans le mélange : *le sérum d'un lapin immunisé contre le venin de cobra ou de vipère agit indifféremment sur tous les venins que j'ai expérimentés.*

L'action du sérum s'exerce aussi bien dans l'organisme, avant ou après l'envenimation, que *in vitro*. Injectons dans le péritoine ou sous la peau d'un lapin neuf 3 ou 4 centimètres cubes de sérum d'un lapin immunisé contre une dose vingt fois mortelle de venin, et aussitôt après inoculons dans les muscles de la patte une dose deux fois mortelle de venin pur. L'animal ne sera même pas malade; et si, après l'injection de

sérum préventif, nous attendons vingt-quatre ou quarante-huit heures avant d'introduire le venin, nous constaterons encore que celui-ci ne produit aucun effet toxique. Notre lapin est donc *immunisé* d'emblée par le sérum qu'il a reçu.

D'autre part, inoculons à un second lapin la même dose deux fois mortelle de venin pur, qui tuera un témoin à peu près en trois heures. Une heure, ou même une heure et demie après, alors que les symptômes de l'envenimation commenceront à se manifester (régurgitations, accélération du cœur, dyspnée, légère parésie des membres), injectons dans le péritoine et sous la peau en divers points du corps 6 ou 8 c. c. de notre sérum immunisant. L'animal reste pendant plus ou moins longtemps dans un état de malaise alarmant, caractérisé d'abord par un peu d'hypothermie, puis par une fièvre véritable. Sa température s'élève de 1°,5 ou 2° pendant quarante-huit heures, puis redescend graduellement à la normale. Tout accident est, dès lors, écarté, et si nous prélevons du sérum à ce lapin, nous constatons qu'il possède des propriétés préventives et antitoxiques.

Le sérum des animaux immunisés contre les venins est donc non seulement capable d'agir sur ces venins *in vitro*, mais il est encore préventif et thérapeutique, exactement comme celui des animaux immunisés contre la diphtérie ou le tétanos.

Le pouvoir antitoxique *in vitro* est naturellement très variable suivant la dose de venin contre laquelle l'animal qui fournit le sérum est immunisé. 4 c. c. de celui que j'emploie actuellement pour mes essais de thérapeutique, détruit exactement 1 milligramme de venin de cobra ou 12 milligrammes de venin de vipère.

L'injection préventive de 4 ou 5 c. c. de ce sérum à des lapins permet immédiatement à ces animaux de résister à une dose deux fois mortelle de venin pur; l'immunité qu'ils acquièrent ainsi est tout d'abord très solide, mais elle disparaît dans un délai qui, dans mes expériences, n'excède pas six jours. Il est probable toutefois qu'avec les sérums plus actifs qu'il sera facile d'obtenir, on pourra dépasser beaucoup cette limite.

Quoi qu'il en soit, il demeure certain que l'immunité conférée par les sérums n'est pas durable, contrairement à celle qui est produite par les venins eux-mêmes, soit purs, soit mélangés aux hypochlorites alcalins. Cette dernière subsiste pendant un temps beaucoup plus long, mais je ne puis encore donner la

limite de cette durée. Les propriétés antitoxiques de ce sérum disparaissent si on le chauffe à 60°.

Le sérum d'un animal peut manifester des propriétés nettement préventives et antitoxiques à l'égard d'une dose mortelle de venin, sans que l'animal qui a fourni ce sérum soit immunisé.

Si nous injectons, par exemple, 0^{mg} 20 de venin de cobra à un lapin pesant 2 kilogrammes, et que, trois jours après, nous prélevions son sang, nous trouvons que le sérum de ce lapin est préventif à la dose de 6 c. c. à l'égard de 1 milligramme du même venin injecté à un autre animal.

Fait plus remarquable encore, le sang d'un lapin succombant à l'envenimation à la suite d'un traitement trop tardif par le chlorure de chaux, est antitoxique *in vitro* à la dose de 6 c. c. à l'égard de 1 milligramme de venin.

Les propriétés préventives et antitoxiques du sérum ne sont donc nullement corrélatives de l'état d'immunité de l'animal producteur de ce sérum. Elles peuvent apparaître dans des conditions très différentes. On peut même constater qu'elles se développent chez des animaux qui n'ont pas reçu la plus petite trace de venin.

Injectons par exemple à deux lapins, pendant cinq jours de suite, une dose quotidienne de chlorure de chaux dilué, 1 c. c. d'une solution à 1/60. Si nous éprouvons, le 5^e jour, par un milligramme de venin de cobra, l'un des lapins ainsi traités, nous voyons qu'il ne meurt pas. Prélevons alors du sérum à l'autre animal qui n'a pas reçu de venin. 14 c. c. de ce sérum, mélangés *in vitro* à 1 milligramme de venin, et injectés à un lapin neuf, ne le tuent pas, tandis que la même quantité de sérum normal, mélangée à 1 milligramme de venin, tue en 3 ou 4 heures. Donc, le sérum d'un lapin traité préventivement par le chlorure de chaux seul, sans venin, est antitoxique *in vitro*, probablement parce qu'il contient encore un peu d'hypochlorite.

V

TRAITEMENT DE L'ENVENIMATION

Nous avons vu que le sérum des animaux immunisés contre les venins, injectés plus ou moins longtemps après une inoculation venimeuse à des animaux neufs, est capable d'arrêter chez

ceux-ci les symptômes de l'envenimation et de les guérir, en communiquant à leur sérum des propriétés préventives et antitoxiques.

Inoculons à un certain nombre de lapins, sous la peau de la cuisse, une même dose de venin, 1 milligramme de venin de cobra par exemple, et traitons tous ces animaux, sauf quelques témoins, par des injections sous-cutanées et intrapéritonéales de sérum de lapins immunisés contre 4 milligrammes du même venin. Les témoins, non traités, meurent en 3 ou 4 heures.

Les lapins qui reçoivent 5 c. c. de sérum thérapeutique une demi-heure, trois quarts d'heure ou une heure après le venin, *résistent tous*.

Ceux qui reçoivent la même quantité de sérum thérapeutique entre 1 heure et 1 heure 1/2 après le venin résistent dans la proportion de 2 sur 3.

En injectant 8 c. c. de sérum, 1 heure 1/2 après l'envenimation, la guérison est encore la règle.

Passé ce délai, elle n'est plus possible, du moins avec les sérums relativement faibles dont nous disposons actuellement, parce que les éléments sur lesquels agit le venin sont sans doute déjà trop altérés; mais le traitement amène toujours une survie de 30 à 48 heures.

Il est donc probable qu'avec des doses plus considérables de sérums plus actifs, cette limite de temps pourra être encore dépassée.

Néanmoins, tels qu'ils se présentent dès maintenant, les résultats de la *sérum-thérapie* appliquée à l'inoculation venimeuse sont assez engageants pour que l'on puisse affirmer que son efficacité est très supérieure à celle de tous les moyens thérapeutiques actuellement connus.

Puisqu'elle est capable d'arrêter si nettement l'intoxication chez des animaux d'une sensibilité extrême aux venins, comme le lapin et le cobaye, ne sommes-nous pas autorisés à penser que, chez l'homme, son efficacité ne serait pas moindre?

Il convient donc de tenter le plus tôt possible des expériences de nature à nous éclairer sur la valeur pratique de cette méthode. La seule difficulté qui se présente ici est la nécessité de se procurer une quantité assez considérable de venins d'origines diverses pour immuniser de grands animaux, comme on

le fait aujourd'hui couramment pour la diphtérie et le tétanos.

Cette difficulté disparaît dans les pays où les serpents très venimeux abondent, en Australie, au Cap de Bonne-Espérance, et surtout dans l'Inde où, d'après les statistiques du gouvernement britannique, plus de vingt-deux mille personnes succombent chaque année aux morsures de ces animaux.

Il suffirait qu'on pût fournir à l'avance des provisions de sérum thérapeutique aux postes de secours médicaux qui fonctionnent dans la plupart de ces régions. Il ne serait probablement pas nécessaire que ce sérum soit immunisant à l'égard de tel ou tel venin particulier, puisque nous savons — du moins pour ceux que j'ai expérimentés — qu'un sérum préventif et thérapeutique à l'égard du venin de cobra ou d'*hoplocephalus* possède les mêmes propriétés à l'égard de celui de vipère ou de *pseudechis*¹.

Quoi qu'il en soit de l'avenir réservé à cette thérapeutique de l'envenimation par les sérums, on peut, d'après les expériences qui servent de base à ce travail, fixer de la manière suivante la conduite à tenir en présence d'un cas de morsure de serpent venimeux chez l'homme :

1° Placer, si la chose est possible, une ligature élastique modérément serrée entre la plaie d'inoculation et la racine du membre, afin de s'opposer à l'absorption du venin ;

2° Injecter aussitôt, dans la plaie d'inoculation et tout autour jusqu'à une assez grande distance, vingt à trente c. c. d'une solution récente de chlorure de chaux, préférablement au chlorure d'or dont l'efficacité est moindre ;

3° Enlever la ligature élastique dès que les injections ont été pratiquées ; laver la plaie abondamment avec une solution concentrée d'hypochlorite de soude ou de chaux.

Il sera avantageux de soutenir l'énergie cardiaque du blessé à l'aide d'une faible dose de morphine ou de caféine administrée par voie sous-cutanée.

On emploiera, pour les injections de chlorure de chaux ou d'hypochlorite de soude, une solution titrant environ 4 litres à 4 litres 5 de chlore par 1,000 c. c. Au moment de l'usage, on diluera 5 c. c. de cette solution dans 45 c. c. d'eau bouillie.

1. En attendant que ce résultat puisse être atteint, et pour me permettre d'effectuer d'autres expériences sur une plus large échelle, je fais appel au concours de tous les confrères qui pourraient me procurer des venins, soit secs, soit conservés dans de la glycérine puré.

Les dilutions étendues préparées d'avance n'ont plus d'action efficace.

Il n'y a aucun inconvénient à injecter dans le tissu cellulaire et même dans les muscles une assez grande quantité de chlorure de chaux ainsi dilué. Ces injections ne sont nullement douloureuses pour les animaux et elles ne provoquent jamais d'escharres.

J'ai constaté, dans mes expériences, que l'intervention simple à l'aide du chlorure de chaux, sans ligature, était toujours efficace pour le lapin, vingt minutes après l'inoculation sous-cutanée ou intramusculaire d'une dose de venin mortelle pour cet animal en deux heures.

Au delà de vingt minutes et jusqu'à cinquante minutes, l'intervention est encore très souvent utile.

Or, chez l'homme, il est extrêmement rare que la morsure des plus dangereux serpents soit mortelle dans un délai si court. D'après les statistiques de Fayrer, dressées sur un ensemble de 63 cas de morsures de serpents observées dans l'Inde et ayant amené la mort, la durée moyenne de la survie a été la suivante :

Moins de deux heures	proportion de 22,96 0/0
Entre deux et six heures.	— 24,53 —
Entre six et douze heures	— 23,05 —
Entre douze et vingt-quatre heures . .	— 9,36 —
Au delà de vingt-quatre heures	— 21,10 —

En admettant qu'il soit impossible de porter secours en temps utile aux personnes classées dans la 1^{re} catégorie ci-dessus, et qui succombent en moins de deux heures, on voit que le traitement a les plus grandes chances d'être efficace pour toutes les autres, soit pour 77,04 0/0 de celles qui seraient vouées fatalement à la mort.

Ce traitement, avec une substance aussi facile à se procurer que le chlorure de chaux, peut être dès maintenant appliqué partout et permettra de sauver un grand nombre de vies humaines.

Il est évident que les injections de sérum immunisant, dont la puissance thérapeutique est beaucoup plus grande, seront préférables encore. Elles devront constituer, dans l'avenir, le véritable traitement de l'envenimation. Les expériences dont je

cite quelques-unes à la fin de ce mémoire et que j'ai répétées un grand nombre de fois depuis le mois de décembre dernier, sont tellement concordantes que je me suis employé, depuis cette époque, à préparer de grandes quantités de sérum thérapeutique que je mettrai volontiers à la disposition des médecins de nos colonies bien placés pour l'expérimenter.

Ces sérums réussissent, en effet, à arrêter l'envenimation même avancée chez les divers animaux d'expérience que nous avons éprouvés : il est donc probable que leur action sera la même sur l'homme. C'est ce but pratique que nous avons eu surtout en vue et que nous pensons avoir atteint.

APPENDICE

Je donne ici le résumé de quelques-unes de mes expériences de traitement de l'envenimation par le chlorure de chaux et par le sérum de lapins immunisés.

1^o CHLORURE DE CHAUX.

La solution employée est au 1/12. Au moment de l'injecter, on en dilue 5 c. c. dans 45 c. c. d'eau.

1^{re} SÉRIE. — Lapin n° 1, *témoin*. — P. 1^k,940. — Inoculé 1 milligramme de venin de cobra sous la peau de la patte postérieure droite à 11 h. du matin. Mort à 2 h. 45.

Lapin n° 2. — P. 1^k,775. — Même inoculation de venin à 11 h. à la patte postérieure droite. Traité 15 minutes après par 8 c. c. de la dilution de chlorure de chaux en 4 injections disséminées autour de la première inoculation et à la fesse droite. Guérison.

Lapin n° 3. — P. 1^k,640. — Même traitement que le n° 2. Guérison.

Lapin n° 4. — P. 1^k,900. — 1 milligramme de venin à la patte postérieure droite. Traité 30 minutes après par 8 c. c. de la dilution de chlorure de chaux. Mort seulement 8 jours après l'inoculation. Amaigrissement et paralysie des membres postérieurs depuis trois jours. Diarrhée. Aucune lésion spécifique à l'autopsie.

2^o SÉRIE. — Lapin n° 1, *témoin*. — P. 1^k,880. — 2 milligrammes de venin de cobra à la cuisse droite (injection intramusculaire) à 11 h. Mort à 3 h. 50.

Lapin n° 2. — P. 1^k,770. — 2 milligrammes inj. intramusculaire, cuisse droite. Traité 20 minutes après par 8 c. c. de la dilution de chlorure de chaux en 8 injections disséminées dans la cuisse et le flanc droit. Guérison.

Lapin n° 3. — P. 1^k,800. — Même inoculation à 11 h. 12. Traité 25 minutes après par 8 c. c. de dilution de chlorure de chaux. Mort dans la nuit suivante.

Lapin n° 4. — P. 1^k,720. — Même inoculation à 11 h. 18. Traité 30 mi-

nutes après par 10 c. c. de dilution de chlorure de chaux. Mort dans la nuit suivante.

Lapin n° 5. — P. 4k,820. — Même inoculation à 11 h. 20. Traité 30 minutes après par 12 c. c. de dilution de chlorure de chaux. Guérison.

3^e SÉRIE. — Lapin n° 1. — P. 4k,920. — Inoculé sous la peau de la patte droite postérieure, avec 2 milligrammes de venin. Reçoit 10 minutes après 1 centigramme de morphine sous la peau du ventre.

Traité 40 minutes après l'inoculation de venin par 8 c. c. de dilution de chlorure de chaux. Guérison.

Lapin n° 2. — P. 4k,680. — Inoculé sous la peau de la patte droite postérieure, avec 2 milligrammes de venin. Reçoit 10 minutes après 1 centigramme de morphine sous la peau du ventre. Traité 50 minutes après l'inoculation de venin par 10 c. c. de dilution de chlorure de chaux. Guérison.

2^e TRAITEMENT PAR LE SÉRUM.

Le sérum employé provient de cinq lapins immunisés contre 20 à 26 milligrammes de venin de cobra.

Lapin n° 1. — P. 4k,870. — Inoculé à la patte droite postérieure, avec 1 milligramme de venin. 30 minutes après, injection sous-cutanée de 6 c. c. de sérum immunisant, sous la peau du ventre. Guérison.

Lapin n° 2. — P. 4k,780. — Inoculé à la patte avec 1 milligramme de venin. Traité 1 h. 05 après par injection de 6 c. c. de sérum, moitié sous la peau du ventre, moitié dans le péritoine. Guérison.

Lapin n° 3. — P. 4k,830. — 1 milligramme de venin à la patte postérieure droite. Traité 1 h. 15 après, par 6 c. c. de sérum sous la peau du ventre. Guérison. Le sang de ce lapin, prélevé six jours après, est antitoxique *in vitro* à la dose de 2 c. c. pour 1 milligramme de venin.

Lapin n° 4. — P. 4k,550. — 1 milligramme de venin à la patte droite. Traité 1 h. 20 après par 6 c. c. de sérum sous la peau du ventre. Mort seulement après plus de 8 heures.

Lapin n° 5. — P. 4k,900. — 1 milligramme de venin à la patte. Traité 1 h. 31 après, par 8 c. c. de sérum. Guérison.

Lapin n° 6. — P. 2k,220. — 1 milligramme de venin à la patte. Traité 1 h. 17 après par injection sous-cutanée de 2 c. c. seulement de sérum d'un lapin immunisé, qui a reçu un total de 26 milligrammes de venin de cobra. Guérison. (Ce sérum est antitoxique *in vitro*, à la dose de 1/2 c. c. pour un milligramme de venin de cobra.)

Un lapin témoin, du poids de 2 kil., qui reçoit en même temps que les précédents 1 milligramme de venin de cobra, et qui n'est pas traité, meurt en moins de 9 heures et demie.

Cobaye mâle. — P. 0k,510. — Inoculé sous la peau de la cuisse droite, avec 1 milligramme de venin de vipère. Reçoit dans le péritoine, 5 minutes après, 2 c. c. de sérum de lapin immunisé contre le venin de cobra, et antitoxique à la dose de 1/2 c. c. pour 1 milligramme de venin. Guérison.

LE MICROBE DE L'OZÈNE

PAR LE D^r LOEWENBERG.

(Travail du laboratoire de M. METCHNIKOFF à l'Institut Pasteur).

Galien, Hippocrate, Averroës et d'autres médecins de l'antiquité connaissaient déjà une maladie des fosses nasales qui empoisonne l'existence des malheureux qu'elle frappe, et en fait des objets de dégoût pour tous ceux qui les approchent. C'est l'ozène, ou la *punaisie*.

Datant généralement de l'enfance du sujet, elle ne le quitte plus durant toute sa vie, et imprime d'une façon permanente à son haleine une odeur fade et nauséabonde *sui generis*, pire que les émanations de la putréfaction même. Elle adhère jusqu'aux mouchoirs des malades, et j'ai cité, dans un premier travail sur l'ozène¹, l'observation d'une jeune fille du monde dont les blanchisseurs refusaient les mouchoirs, que la malheureuse se voyait obligée de brûler.

A une époque peu éloignée où l'on ne pensait pas encore à explorer l'intérieur du nez, on croyait l'affection en question due à des ulcérations dans les fosses nasales. Depuis, le jour s'est fait, au moins quant aux lésions qui constituent la maladie. Elle ne s'accompagne pas d'ulcérations, mais d'altérations bien plus curieuses : dans le cours de l'ozène, la *muqueuse* qui tapisse l'intérieur du nez, d'épaisse et pleine de suc qu'elle est normalement, s'*atrophie* et finit par être réduite à une mince pellicule, couverte, par places, de croûtes extrêmement adhérentes dans lesquelles se concentre le *foetor* caractéristique.

Les os mêmes de la charpente nasale subissent le processus atrophiant ; les cornets se réduisent à de minces bourrelets. En échange, grâce à ce rapetissement des os, les méats nasaux

1. B. LOEWENBERG, De la nature et du traitement de l'ozène (3^e congrès otologique international. Bâle, 1884; reproduit dans l'*Union médicale*, 1884.)

s'élargissent et permettent à l'observateur de voir le fond du pharynx nasal.

Dès l'année 1880, j'ai étudié cette mystérieuse affection, surtout du côté microbiologique, et j'ai publié les résultats de mes premières recherches dans le travail cité plus haut. Comme je l'avais déjà fait entrevoir, d'ailleurs, au Congrès médical international de Londres (1881), dans la discussion des communications sur cette affection, j'avais constamment trouvé dans le mucus nasal des punais un microbe spécial, unique et caractéristique. Voici quelques passages de ce travail, qui résument la description du microorganisme :

« C'est un très gros coccus immobile, associé toujours, pour ainsi dire, en doubles, et ceux-ci souvent accouplés en chaînes. Ces chaînes sont réunies par une masse hyaline. Quelquefois la section optique (des microbes) est presque rectangulaire, comme s'ils étaient cylindriques, au lieu d'être amincis et arrondis aux deux extrémités¹. En les examinant avec les plus forts grossissements, après les avoir colorés, surtout au violet de gentiane, j'ai quelquefois reconnu vers leur milieu une zone transversale plus claire.

« Quant à la *méthode d'examen*, il n'est pas besoin de préparation spéciale pour trouver ce microbe ; le premier coup d'œil jeté sur une parcelle de mucus ozénique le montre généralement en quantités innombrables. Je recommande cependant de choisir des couches minces et surtout de prendre les *filaments muqueux* que j'ai toujours vus tendus entre le septum et les cornets. Je conserve des préparations où ces filaments, simplement étalés sur le porte-objet et colorés avec une couleur d'aniline, ne montrent pas autre chose, — en dehors de quelques leucocytes, bien entendu, — qu'une multitude infinie de diplococcus exactement pareille à une culture pure, etc. (j'ai montré des préparations de ce genre au congrès de Bâle).

« Les couleurs d'aniline donnent des images magnifiques, surtout la fuchsine et le violet de gentiane. Le microbe ne se colore pas par la méthode de Gram.

1. J'avais donné le nom de coccus à ce microbe, de même que Friedlaender avait nommé pneumococque celui qu'il a découvert, et auquel le mien ressemble d'une façon frappante, mais je signalais en même temps, comme on vient de le voir, les caractères qui permettaient de l'appeler soit un coccus, soit un bacille court et trapu. Je le nommerai donc désormais *cocco-bacille de l'ozène*.

« Dans un seul cas (petite fille chétive de huit ans), j'ai vu, outre le coccus caractéristique, de très nombreux bacilles; j'ai constaté la même chose dans des examens fréquemment répétés chez la même enfant. J'ajoute que, dans ce seul cas, le mucus nasal était neutre, tandis que, dans tous les autres, il bleussait le papier rouge de tournesol. Quant aux autres symptômes et aux résultats thérapeutiques, ce cas ressemblait à tous ceux que j'ai observés. *Le coccus ressemble à celui de la pneumonie infectieuse* (ce qui, à l'époque où ce travail fut publié, signifiait : au pneumobacille de Friedlaender). »

J'arrête ici ces citations qui renferment les principaux caractères du microbe de l'ozène, tels que je les ai énoncés en 1884. Au point de vue morphologique, il n'y aurait guère de traits à ajouter. J'avais cependant été frappé, dès mes premières recherches, de ce que ce microorganisme, tel qu'il se présente dans le mucus ozénique, se montre la plupart du temps *encapsulé*, et je faisais déjà allusion à ce fait en disant que « les chaînes formées par ce microbe sont réunies par une masse hyaline » (v. la citation ci-dessus).

Je ne voulais d'abord parler *in extenso* de cette capsule qu'après une étude complète de tous ses caractères, mais je me suis bientôt décidé à annoncer la découverte de cette enveloppe dans une note accompagnant la présentation de mon opuscule sur l'ozène à la Société des sciences médicales de Gannat (Allier).

Dans cette note, je décrivais expressément, ainsi que cela ressort des comptes rendus de la Société, *autour des cocci, une zone claire, une capsule*¹.

Cette présentation a été faite en février 1885. Or, au mois d'août de la même année, le Dr Klamann, de Luckenwalde, a décrit des cocci encapsulés dans l'ozène², sans mentionner ma description antérieure qui lui avait certainement échappé. Omission analogue de la part du Dr Thost qui, un an plus tard, décrivit³ dans l'ozène un microbe absolument pareil au mien.

1. Voir *Comptes rendus des travaux de la Société des sciences médicales de Gannat (Allier)*, année 1884-1885, p. 97. Paris, A. Delahaye et Lecrosnier, 1885.

2. *Allgemeine medicinische Centralzeitung*, 20 août 1885.

3. *Deutsche medicinische Wochenschrift*, n° 40, 1886.

I

ÉTUDE BACTÉRIOLOGIQUE DU MICROBE DE L'OZÈNE

Quand on ensemente avec du mucus ozénique un des milieux de culture ordinaires, en vue d'étudier le microbe spécial, le mieux est, comme je l'ai conseillé jadis pour les préparations microscopiques, d'emprunter une petite parcelle à un des filaments muqueux mentionnés plus haut ¹.

Sur plaques de gélatine, il se développe déjà, à la température ordinaire, des colonies quelquefois tellement abondantes que toute la masse en est parsemée.

Ces colonies peuvent se montrer — dans la même plaque — sous deux aspects différents :

1° De petites colonies rondes, *jaunâtres*, d'apparence compacte, situées dans l'épaisseur de la gélatine (cette catégorie manque souvent) ;

2° De colonies plus grandes, demi-transparentes, d'un *blanc plus ou moins laiteux*, qui occupent la surface de la masse ; ces colonies ne manquent jamais.

D'abord circulaires, celles-ci prennent quelquefois, en augmentant de volume, des contours ovoïdes, pyriformes, ou encore plus irréguliers quand elles arrivent au contact les unes des autres. Après un certain temps, la substance de ces colonies devient plus laiteuse ou légèrement jaunâtre. Quelquefois, à mesure que la dessiccation de la gélatine s'avance, elles prennent un aspect grumeleux ou coupé de cercles concentriques (pareil à celui d'un grain d'amidon de pomme de terre vu au microscope).

La masse des colonies n° 2 paraît souvent molle, comme semi-liquide.

Ni les colonies n° 1, ni celles n° 2 ne liquéfient la gélatine, propriété qui fait absolument défaut au microbe de l'ozène.

En poussant cette étude plus loin, on peut se convaincre aisément qu'en réalité les deux groupes de colonies ne forment qu'une

1. Quant à la formation de ces fils muqueux, elle est due, à mon avis, à la viscosité particulière des masses sécrétées dans l'ozène. Lorsque le malade, en se mouchant, parvient à les expulser, il en adhère aux deux parois opposées de la fosse nasale des résidus réunis entre eux par un de ces filaments, qui résistent, tenaces, aux expirations forcées. Dans les autres affections de l'intérieur du nez, ces fils, d'après mon expérience, manquent, ou, du moins, se montrent beaucoup plus rarement.

seule espèce : elles montrent le même microbe ; les colonies n° 1, lorsqu'elles sont situées assez superficiellement pour pouvoir, en grandissant, arriver au contact de l'air, prennent, en y parvenant, la forme et la coloration de celles de la deuxième classe ; en ensemençant de nouvelles plaques avec l'une ou l'autre espèce de colonies, on obtiendra ainsi toujours de nouveau les deux sortes ; enfin on peut transformer artificiellement le n° 1 en n° 2 ; pour cela on n'a qu'à piquer avec le fil de platine préalablement flambé une des colonies jaunes situées dans l'épaisseur de la gélatine. En facilitant ainsi l'accès de l'air, on voit bientôt fuser vers la surface une traînée blanche qui part de la colonie piquée et finit par former une des agglomérations blanches n° 2. C'est donc la position à la surface ou dans la profondeur qui donne à ces colonies leurs apparences diverses.

Voilà les seules colonies que la culture du mucus donne constamment dans l'ozène.

Ce fait concorde avec celui que j'ai cité plus haut, en disant que les préparations microscopiques faites avec ce même mucus présentaient déjà (presque toujours) l'aspect d'une culture pure du cocco-bacille spécial.

En dehors du microbe caractéristique, on trouve bien dans quelques-unes des cultures des colonies d'autres microorganismes, mais qui, chose importante, sont différents selon les cas et, par conséquent, ne jouent aucun rôle dans l'ozène.

Il résulte de ce qui précède que c'est bien un microbe particulier unique et bien défini qui caractérise l'ozène, et l'examen microscopique des cultures prouve, de plus, que c'est bien le cocco-bacille décrit par moi en 1884. C'est lui qui forme les deux espèces de colonies, mais on l'y voit souvent sans capsule.

Ce fait n'a rien d'étonnant, car les microbes qu'on trouve encapsulés dans le sang ou le parenchyme des organes ou à la surface des muqueuses, n'offrent pas toujours ce caractère dans les cultures. Nous allons d'ailleurs développer ce point davantage plus loin.

Lorsqu'onensemence ce microorganisme par *piqure dans la gélatine*, on voit se former, au bout de peu de temps, tout le long du passage du fil de platine, une bande contenant plusieurs rangées parallèles de grains plus ou moins fins, de couleur jaunâtre. A la surface de la gélatine, il se forme un disque d'un

blanc opaque, qui envahit graduellement une étendue plus ou moins grande. Il s'épaissit en même temps, mais généralement sans atteindre la forme de tête de clou exubérante qui caractérise le pneumobacille.

Lorsque la culture se dessèche, elle finit par être coupée au milieu par une fente profonde dont les surfaces intérieures, en contact avec l'air, se revêtent de la même substance blanchâtre qui forme le disque supérieur surmontant la culture fraîche.

Même dans des cultures desséchées, le microbe conserve sa vitalité pendant plusieurs mois. Il est d'ailleurs tellement résistant qu'il pousse même sur de la gélatine à réaction acide. Il se cultive jusqu'à la température de 43°,4. La limite supérieure est vers 44°. Étalaé en couche mince, il meurt au bout d'une minute de contact avec de l'eau à 54°. J'utilise cette propriété pour le traitement de l'ozène au moyen d'injections nasales chaudes.

Sur *gélose*, le microbe forme une couche unie d'un blanc sale tirant sur le gris.

Elle paraît luisante et comme moite, et est, en effet, souvent semi-liquide. Les colonies isolées forment des disques d'un blanc grisâtre un peu opalescent. Sous un faible grossissement, elles présentent, comme d'ailleurs toutes les colonies isolées de ce microbe, un contour circulaire et un aspect uniformément grenu.

En *piqûre dans la gélose*, le microbe ne forme pas de disque en « tête de clou », mais un enduit blanc grisâtre, opalescent, d'épaisseur égale sur toute la surface.

Sur le *sérum* humain ou animal, les cultures ressemblent beaucoup à celles sur *gélose*.

Ensemencé dans du *bouillon* peptonisé (sucré ou non), le microbe forme lentement, au fond, un petit dépôt, composé souvent de grumeaux et de filaments, au-dessus duquel le liquide paraît clair. Le bouillon ne dégage pas de gaz et reste alcalin.

Le *cocco-bacille* de l'ozène se développe très bien sur *la pomme de terre*. Il commence par y former des traînées blanchâtres ou jaunâtres, d'apparence grasse, qui s'étalent, souvent, au point de confluer. Plus tard, elles deviennent de plus en plus foncées et finissent par prendre une coloration tout à fait brune qui se communique même à la masse de la pomme de terre. Les colonies restées isolées ont d'abord l'apparence de gouttelettes ou de petites perles d'un blanc tirant sur le jaune.

En culture anaérobie, le microbe pousse bien, mais plus péniblement qu'à l'air, et forme quelquefois des colonies fusiformes.

La maladie caractérisée par ce microbe, présentant comme signe particulier la production de l'épouvantable odeur si connue, il était extrêmement important de rechercher si les cultures pures du microorganisme spécial donnent des produits odorants, et, surtout, si elles produisent les exhalaisons propres à l'ozène. Dans mes publications antérieures, je n'ai pas touché ce point; c'est donc à tort qu'on m'a fait dire que les cultures du microbe spécial donnent l'odeur du mucus ozénique.

Par contre, les recherches auxquelles je me suis livré dans ces dernières années m'ont donné le résultat curieux que *ce microbe donne dans presque tous les milieux de culture des produits odorants, et, fait bien inattendu, que les odeurs qu'il dégage sont dans la majorité agréables*. Ainsi, sur les plaques de gélatine un peu vieilles, il exhale un parfum ressemblant à celui des fleurs de sureau ou de celles du troëne (*Ligustrum vulgare*). Même chose pour les cultures sur gélose. En piqûres dans la gélatine, un peu vieilles, même odeur. Je n'ai pas trouvé de senteur appréciable aux cultures dans du bouillon peptonisé (sucré ou non). Sur pommes de terre, le microbe produit une odeur aromatique comparable à celle du sambayon (*sambagione*, sauce au vin blanc). Sur le sérum, il donne également une odeur aromatique, comme éthérée.

Les cultures du microbe donnent donc, avec les milieux ordinaires usités en bactériologie, des senteurs nettement caractérisées et agréables, tandis que, dans les fosses nasales des malheureux atteints d'ozène, il produit une des puanteurs des plus répugnantes. Ce n'est qu'en semant le microbe sur de la viande fraîche ou stérilisée par la chaleur que j'ai obtenue, en plaçant les tubes de culture à l'étuve, une odeur très désagréable. Pourtant elle ne rappelait pas l'ozène, mais ressemblait à l'odeur de la putréfaction avec une légère addition de senteur ammoniacale. En culture anaérobie, le microbe donne également quelquefois une odeur désagréable, différente de celle de l'ozène.

Que faut-il conclure de cet ensemble de faits ?

Si le microbe produit dans les fosses nasales des ozéneux l'épouvantable odeur que l'on sait, et si, d'autre part, sa culture dans les milieux usités en bactériologie ne la reproduit pas,

il ne s'ensuit pas, comme certains auteurs l'affirment, que le microorganisme que j'ai découvert ne soit pas le facteur de l'odeur (et de la maladie). D'une part, le fait qu'il donne des senteurs avec pour ainsi dire toutes les substances nutritives est déjà assez significatif. D'autre part, si l'on passe en revue les maladies qui s'accompagnent de la production d'une odeur particulière et de la présence d'un microbe spécial, on constate qu'aucune des cultures du microorganisme propre à chacune de ces affections ne donne l'odeur créée par celles-ci, si ce n'est celui de la bronchite putride.

Si donc les cultures du cocco-bacille de l'ozène ne reproduisent pas les exhalaisons caractéristiques pour cette affection, il ne faut pas en conclure qu'elles ne soient pas dues *in vivo* à l'action de ce microbe, mais il faut admettre, d'une façon générale, que nos milieux de culture habituels, tout en permettant à certains microbes de pulluler, ne réalisent point les conditions que la nature leur fournit dans l'organisme.

J'ai tenté de me rapprocher davantage des conditions de vie habituelles au microbe en essayant de le cultiver sur des *milieux naturels*, tels que le sérum humain, la viande crue, l'œuf de poule, et même le mucus nasal stérilisé; mais sur aucune de ces substances l'odeur ozénique ne s'est produite.

La capsule dans les cultures ozéniques. — Le microbe de l'ozène est généralement encapsulé quand on l'examine dans le mucus nasal des malades, et *toujours* dans le sang des animaux morts à la suite de son injection. Quand on colore une couche mince de ce sang à la fuchsine (solution de Ziehl, par exemple), les capsules restent généralement blanches, tandis que la solution de Ribbert les teint presque toujours admirablement.

La présence de cette enveloppe dans les cultures est fort variable : tantôt elle existe, tantôt, dans lesensemencements faits sous les mêmes conditions, on ne la constate pas, quel que soit d'ailleurs le milieu choisi (sang, viande, œuf, gélose, gélatine, etc.).

Nous avons vu plus haut que quelquefois d'autres microbes que celui de la punaisie éclosent, à côté de lui, sur les plaques ensemencées avec du mucus ozénique, mais qu'ils ne forment jamais qu'un nombre insignifiant de colonies, par rapport à celles

du cocco-bacille spécial, et, fait important, que c'est tantôt telle espèce, tantôt telle autre qui éclot; il ne s'agit donc là que d'hôtes accidentels, amenés dans les fosses nasales par l'air inspiré.

La rareté, chez les ozéneux, de microbes autres que celui qui caractérise l'affection, surprend de prime abord, car chaque inspiration fait passer dans les méandres nasaux un grand nombre de germes de l'air qui sont arrêtés et retenus par la muqueuse nasale, surtout dans l'ozène où la sécrétion est particulièrement gluante. Il fallait donc s'attendre, *a priori*, à voir éclore, dans les cultures faites avec du mucus nasal quelconque, les échantillons les plus variés de la flore des microbes. Eh bien, l'examen bactériologique souvent répété et portant sur bien des sujets, des produits de la membrane de Schneider, m'a démontré qu'il n'en est rien. Le mucus nasal normal montre peu de microorganismes, et il en est de même, d'après mes recherches, pour la plupart des affections intranasales, autres que celles dont traite ce travail. J'ai constaté ce fait, par exemple, dans un cas de *syphilis tertiaire du nez*, appelé improprement *ozène syphilitique*, avec nécrose étendue des cornets et du plancher du nez. Là encore, le pus, extrêmement fétide et sécrété en abondance, contenait peu de microbes, et ni les préparations microscopiques, ni les cultures ne ressemblaient à celles de l'ozène vrai. J'ajoute, en passant, que l'odeur insupportable produite par cette affection vénérienne des fosses nasales était toute différente de celle de la punaisie, et avait plutôt quelque chose d'excrémentitiel. Les quelques microbes trouvés dans le pus nasal de ce malade ne possédaient pas les caractères de ceux de l'ozène; ils n'offraient pas non plus ceux des bacilles de Lustgarten.

Dans l'ozène vrai, contrairement à d'autres affections intranasales, le mucus est peuplé par le cocco-bacille particulier, qui, non seulement domine sur toute la surface interne du nez, mais est encore abondant dans le pharynx nasal (*loc. cit.*, p. 10).

Le microbe de l'ozène et le pneumobacille comparés au point de vue de leurs cultures artificielles. — Dès mes premières recherches sur l'ozène, j'ai été frappé de la ressemblance du microbe que je venais de découvrir dans cette maladie, avec celui que Friedlaender avait trouvé dans la pneumonie. Même forme, même

capsule, même coloration par les couleurs d'aniline et même décoloration par le procédé de Gram. Aussi ai-je déjà signalé cette ressemblance dans mon premier travail (v. le passage cité page 294).

Peu de temps après, M. Klamann (*loc. cit.*) disait qu'il est possible que les deux soient identiques, et M. Thost (*loc. cit.*), faisant un pas de plus, affirmait qu'ils ne forment qu'un seul et même microbe. Dès lors on a pris l'habitude de considérer le microbe de l'ozène comme un pneumobacille atténué.

Il est vrai que, non seulement ils paraissent pareils dans les préparations microscopiques, mais que leurs cultures présentent également les plus grandes ressemblances. Cependant une étude attentive et prolongée de cette importante question m'a fait découvrir entre les cultures des deux microbes les divergences suivantes :

1° Pour ce qui est des cultures sur gélose de l'un et de l'autre, celles du pneumobacille ont souvent les bords comme festonnés, et la bande formée par la masse des cocco-bacilles ressemble vaguement à un fragment de ténia ou (pour ceux familiarisés avec la faune des flaques d'eau de nos forêts), aux planarias. Les cultures du microbe de l'ozène ont des bords rectilignes et la surface lisse, d'un luisant humide. Les colonies isolées du cocco-bacille sur gélose sont plus claires et plus blanchâtres que celles de l'autre microbe, qui paraissent plus opaques et tirent un peu sur le jaune. Il en est de même pour l'ensemble de la culture. La masse est plus diffuente chez le microbe de l'ozène que dans le pneumobacille, et descend le long du tube chez le premier ;

2° *Ensemencé dans du lait stérilisé*, le cocco-bacille de l'ozène ne s'y développe guère d'une façon perceptible, et ne change pas la nature du milieu. Le pneumo-bacille, au contraire, y prospère très bien, dégage parfois des gaz et fait coaguler le lait en l'acidifiant. Il est bon de noter que la coagulation n'a lieu quelquefois qu'au bout d'un certain temps ;

3° *J'ai trouvé des différences capitales quant aux odeurs produites par les cultures respectives des deux microorganismes. Ensemencé sur de la gélose, le pneumobacille dégage toujours (fait que je n'ai trouvé mentionné nulle part), une forte odeur de triméthylamine, et rend alcalin le milieu de culture, s'il ne l'était pas déjà auparavant.*

Il produit, d'ailleurs, selon mes recherches, cette senteur partout où l'air trouve un accès facile, par exemple dans toutes les cultures étalées en surface et dans les plaques de gélatine. On la constate également sur les piqûres dans cette substance lorsqu'elles sont un peu vieilles. Les plaques dégagent, après un certain temps, une odeur de vieux fromage. Dans le bouillon peptonisé, on trouve l'odeur de la triméthylamine.

Il n'y a que sur la pomme de terre que le pneumobacille donne une senteur plutôt agréable, qui ressemble beaucoup à celle produite sur la même substance par le microbe de l'ozène. Quelquefois, cependant, j'ai trouvé aussi à ces cultures un mélange d'une senteur désagréable d'acide butyrique.

Sur les autres milieux le pneumobacille donne toujours des odeurs déplaisantes, contrairement à son sosie de l'ozène qui en produit d'agréables, comme nous l'avons vu. Ce n'est que sur de la viande fraîche ou stérilisée par la chaleur, qu'ils donnent, l'un et l'autre, de très mauvaises odeurs, mais, là encore, elles sont différentes : tandis que le pneumobacille y produit une senteur de putréfaction et de triméthylamine, le cocco-bacille de l'ozène donne une odeur de putréfaction également, mais différente de l'autre et un peu ammoniacale.

Nous constatons donc, en résumé, que si les deux microbes, examinés au microscope, présentent de grandes ressemblances, ils montrent, néanmoins, de remarquables différences quant à certains détails d'aspect de leurs cultures, aux odeurs qu'elles dégagent et à leur action sur le lait.

Nous verrons, d'ailleurs, dans la seconde partie de ce travail, des preuves expérimentales beaucoup plus concluantes encore de la non-identité des deux microbes.

Il faut rappeler ici qu'on considère également comme un pneumobacille atténué un microorganisme trouvé dans une maladie rare et bien curieuse des fosses nasales, le *Rhinosclérome*. Dans cette affection, qu'on n'observe pas dans l'ouest de l'Europe, M. von Frisch, le premier, a décrit, en 1882, un bacille que plusieurs savants¹, entre autres M. Netter, déclarent identique à celui de Friedlaender. Or, le rhinosclérome provoque, dans

1. GÜNTHER (*Einführung in das Studium der Bakteriologie*, p. 204) dit : « Le rhinobacille » (c'est-à-dire le microbe du rhinosclérome) ne se distingue en aucune façon du pneumobacille, si ce n'est que sa virulence semble un peu moindre.

les fosses nasales, des lésions pour ainsi dire diamétralement opposées à celles que l'ozène y engendre.

Dans la première de ces deux affections, la membrane de Schneider et, plus tard, même, le squelette du nez, présentent un épaissement des plus considérables, pouvant amener l'obstruction complète des fosses nasales, comme également du larynx.

Dans l'ozène, au contraire, il y a atrophie de la muqueuse et même de certains os du nez et, par suite, élargissement caractéristique de son intérieur. Par conséquent, et malgré toutes les ressemblances que les auteurs ont trouvées entre le bacille du rhinosclérome et le pneumobacille d'une part, et, d'autre part, entre ce dernier et celui de l'ozène, il me semble impossible d'admettre que des lésions aussi parfaitement opposées que celles dues à ces deux affections (hypertrophie dans l'une, atrophie dans l'autre) puissent être provoquées par le même microbe.

Ce doute est puissamment fortifié par le fait que *le bacille du rhinosclérome se colore par le procédé de Gram*, tandis que les deux autres ne se colorent pas.

Autres microbes trouvés dans l'ozène. — Parmi les autres travaux publiés sur l'ozène, je passe sous silence ceux qui se sont contentés d'affirmations ou de négations théoriques, et j'arrive à un important mémoire de M. Hajek¹, dont les principales conclusions (erronées, selon moi) ont passé dans tous les livres. *L'auteur confirme d'abord, comme M. Thost, la présence constante dans l'ozène d'un microbe identique au mien*, qu'il croit, d'ailleurs, lui aussi, être celui de Friedlaender, mais il n'admet pas de relation de cause à effet entre lui et la maladie.

Il décrit ensuite un bacille court qu'il a trouvé dans sept cas d'ozène sur dix étudiés par lui bactériologiquement. D'après lui, ce microbe, extrêmement mobile, liquéfie très rapidement la gélatine, et lui donne, ainsi qu'à d'autres milieux de culture, une odeur extrêmement semblable à celle de l'ozène. Injecté sous la peau d'un lapin, il détermine une inflammation d'une violence extraordinaire qui amène rapidement la gangrène.

M. Hajek pense que ce bacille liquéfiant, qu'il appelle *Bacillus foetidus ozaenae*, est très probablement la cause de l'odeur *sui generis*. Je crois que M. Hajek a fait erreur et a pris un hôte acci-

1. M. HAJEK, Die Bakterien bei der acuten und chronischen Coryza, sowie bei der Ozaena und deren Beziehungen zu den genannten Krankheiten (in *Berliner klinische Wochenschrift*, 13 août 1888).

dentel des fosses nasales pour le microbe propre à cette maladie. Je passe rapidement sur le fait qu'il ne l'a trouvé que sept fois sur dix cas examinés. Pour moi, sur les centaines de plaques que j'ai faites avec de la gélatineensemencée de mucus ozénique, je n'ai rencontré des microbes liquéfiant que rarement, et encore là où il s'en trouvait, le nombre de leurs colonies était insignifiant. J'ai même été surpris de cette rareté, et on peut se demander si le mucus nasal n'entraverait pas particulièrement les qualités vitales des microbes *liquéfiant*s.¹ ?

Un autre travail important sur la bactériologie de l'ozène a été publié ensuite par M. *Marano*². L'auteur y dépeint le microbe particulier d'une façon absolument conforme à ce que j'en avais dit. Quant à la capsule, il croit qu'elle m'a échappé.

M. Marano a remarqué comme moi l'existence de deux sortes de colonies, les unes petites et jaunes, les autres grandes et blanchâtres, mais sans reconnaître que ces différences d'aspect dépendent uniquement de la place superficielle ou profonde occupée sur la gélatine. D'autres espèces que le cocco-bacille de l'ozène, le pneumobacille par exemple, ou même diverses levures, présentent la même particularité, et, dans une culture en piqûre sur la gélatine, le même tube montre, tant avec le cocco-bacille de l'ozène qu'avec le pneumobacille, des colonies blanches et copieuses à la surface (clou) et des colonies plus petites et jaunes dans la profondeur.

M. Marano pense que les deux espèces de colonies sont formées par des organismes différents, et il appuie son opinion sur la diversité des formes observées au microscope dans les deux groupes. Mais on sait que les cultures pures d'un même micro-organisme (surtout quand elles sont un peu anciennes) présentent parfois des formes très variées. Tel est le cas pour notre microbe qui montre, selon la nature du milieu ou l'ancienneté de la culture, des formes ressemblant tantôt à des cocci, tantôt à des bacilles, en passant par toutes les configurations intermédiaires.

1. Les cultures sur gélatine sont souvent compromises par des mucédinées liquéfiantes. J'arrive à me débarrasser de ces hôtes incommodes en les touchant avec la pointe d'un galvano-cautère ou plus simplement avec un fil de platine rougi.

2. SALVATORE MARANO, Sulla natura dell'ozena (Studi storici e batteriologici). In : *Archivii italiani di Laringologia*, Janvier 1890.

L'auteur italien ajoute encore que les colonies jaunâtres liquéfient rapidement la gélatine. C'est un point sur lequel je ne suis pas d'accord avec lui. Les colonies jaunes possédant cette propriété étaient certainement des impuretés.

Les derniers travaux en date que je connaisse sur la bactériologie de l'ozène sont dus à M. Strazza et à M. Laurent. Le premier, que je connais seulement par un résumé assez succinct ¹, annonce que le microbe est pathogène pour les cobayes. Le résumé du mémoire de M. Laurent ² ne contient aucun fait nouveau.

II

EXPÉRIENCES SUR LES ANIMAUX

1^o *Propriétés pathogènes du microbe de l'ozène.* — J'ai exposé dans mon premier mémoire (1884) et dans les pages précédentes du présent travail, les caractères du cocco-bacille de l'ozène qui prouvent déjà, à mon avis, qu'il constitue réellement un microbe *sui generis*. Cette démonstration trouvera une confirmation nouvelle et encore plus décisive dans les résultats des expériences qui vont être exposées maintenant. Elles ont trait à l'action de ce cocco-bacille sur les animaux, et ont été instituées surtout dans le but de vérifier s'il est pathogène ou non pour eux.

Les cultures sur gélose étant plus virulentes que sur gélatine ou dans le bouillon, c'est d'elles que je me suis servi. Mes inoculations ont toujours été faites, sauf mention du contraire, avec l'enduit d'une culture de vingt-quatre heures sur gélose à 37°5, délayé dans 3 c. c. de bouillon peptonisé et stérilisé. Cette émulsion du microbe de l'ozène est éminemment pathogène.

Inoculée à des *souris*, blanches ³ ou grises, par la voie hypodermique, elle les tue, même à la dose d'un vingtième de centimètre cube. La mort arrive quelquefois en moins de vingt heures.

1. Dr STRAZZA, Osservazioni bacteriologici sull'ozena, in: *Atti del primo congresso della Società italiana di Laringologia, etc.*, Florence, 1892, p. 202 et 203.

2. Dr LAURENT, La bactériologie de l'ozène, in: *Compte rendu de la Société belge d'Otologie, etc.* (4 juin 1893), donné par la *Revue de Laryngologie, etc.*, 1893, p. 574 et 575.

3. Lorsqu'il ne sera pas fait de mention spéciale dans la suite, il s'agira toujours de *souris blanches*.

A plus faible dose, ou quand on emploie une culture déjà vieille, les animaux pourront ne succomber que le lendemain ou même plus tard. Mais, en définitive, aucune des trente et une souris ainsi traitées n'a survécu (à l'exception d'une seule, le n° 22, sur laquelle nous reviendrons plus loin).

Après l'inoculation, les souris perdent vite leur agilité caractéristique; la respiration s'accélère, et le poil se hérisse. Généralement, les animaux tiennent un œil ou les deux fermés. Les bords de la fente palpébrale sont souvent chassieux, mais la cornée reste claire. Les matières purulentes de l'œil ne m'ont pas donné le microbe de l'ozène en culture, dans le seul cas que j'ai examiné sous ce rapport¹. L'appétit semble persister, parfois jusqu'à la fin.

L'autopsie ne révèle quelquefois aucune lésion particulière; d'autres fois elle montre un gonflement du foie et de la rate. A l'endroit de l'injection, on constate souvent une infiltration pénétrant plus ou moins profondément dans les parties sous-jacentes. Les poumons n'offrent pas d'altération macroscopique; ils sont d'un beau rose et surnagent sur l'eau; donc, pas de pneumonie! Ce résultat offre un certain intérêt, quand on considère le rôle souvent attribué, dans la genèse de cette affection, au pneumobacille, que presque tous les auteurs identifient avec le microbe de l'ozène.

Une seule souris a présenté de l'ascite et un épanchement dans la plèvre. Lesensemencements faits avec ces deux liquides ont donné le microbe de l'ozène à l'état de pureté.

Chez toutes ces souris, le sang pris dans le cœur avec les précautions habituelles montrait une quantité innombrable de magnifiques cocco-bacilles entourés de leurs capsules, et donnait invariablement des cultures pures, caractéristiques et abondantes, du microbe de l'ozène.

Par contre, je puis affirmer, d'après les coupes que j'ai faites des poumons, du foie et du cœur de ces animaux, que les microbes ne se trouvent pas dans les tissus des organes en dehors des voies sanguines.

1. Chez plusieurs personnes atteintes d'ozène et de *maladies des yeux*, surtout de kératites, qui m'ont été adressées par des oculistes de mes amis pour rechercher le cocco-bacille de la punaisie dans le liquide du sac conjonctival, je n'ai jamais pu l'y constater.

Les cobayes résistent à l'inoculation sous-cutanée du microbe, mais succombent sans exception à son injection dans la cavité abdominale, à la suite de laquelle ils meurent le lendemain ou le surlendemain. Même ceux qui ont supporté l'introduction préalable de ce microorganisme sous la peau ne sont aucunement vaccinés de ce fait, mais succombent, après l'injection d'une culture suffisamment fraîche dans la cavité abdominale, aussi vite que les animaux témoins.

Voici, pour démontrer l'action du microbe sur les cochons d'Inde, l'histoire de quelques-uns des animaux ainsi inoculés :

Un cobaye avait d'abord reçu sous la peau une culture entière du coccobacille et supporta ensuite l'injection, dans l'abdomen, d'une petite quantité d'une culture affaiblie, vieille de 51 jours, et qui avait, par conséquent, perdu beaucoup de sa virulence. Deux mois et demi après, il reçut, dans la même cavité, une plus grande quantité de virus encore plus ancien, c'est-à-dire la moitié d'une culture vieille de 68 jours. Il fut néanmoins malade le lendemain et mourut le troisième jour.

A l'autopsie, on trouve, chez les cobayes tués de cette façon, une péritonite généralisée, souvent des fausses membranes sur telle ou telle partie du péritoine, par exemple sur la face convexe du foie, et de l'ascite avec liquide abondant, louche et souvent rempli de grumeaux. Tous ces exsudats donnent des cultures pures du bacille.

Un autre cochon d'Inde avait d'abord subi l'inoculation d'une culture du microbe de l'ozène sous la peau du dos. Il résista ensuite également à l'injection, dans l'abdomen, d'une culture vieille de 36 jours, très-affaiblie certainement, car elle avait été inoculée également à la souris n° 22 et à un lapin, sans les tuer (v. plus loin pour ces deux animaux). Il reçut ensuite le 26 juin, dans la cavité péritonéale, une portion d'une culture rajeunie de la veille sur gélose, et provenant du sang du cœur d'un autre cobaye qui avait succombé à l'injection du microbe de l'ozène. (Le reste du tube fut injecté aux deux animaux sus-mentionnés). Il fut souffrant le lendemain et avait le poil hérissé, mais il mangeait. Je le trouvai mort le 27 juin au matin.

A l'autopsie de ce cochon d'Inde, on trouva d'abord les lésions ordinaires dues à la péritonite et une ascite avec liquide abondant. En outre, le côté externe du testicule droit était occupé par une masse jaunâtre, d'apparence compacte. L'organe fut sectionné avec les précautions ordinaires, et des cultures furent faites avec la masse jaune. Elles donnèrent le microbe de l'ozène à l'état de pureté, et en plus grande abondance même que celles du sang qui contenaient fort peu de coccobacilles. Malheureusement la pièce a été jetée avec le corps du cobaye, avant que son examen microscopique ait pu être pratiqué. Il m'a cependant semblé qu'il s'agissait là simplement d'une infiltration partielle du testicule par les microbes, due peut-être à une piqûre de cet organe par l'aiguille de la seringue.

D'autres cobayes ayant péri avec les mêmes symptômes que le premier, à la suite des inoculations ozéniques, il est inutile d'ajouter la description des autres expériences faites sur ces animaux.

Lapins. — Un vigoureux lapin pesant 1,690 gr. reçut le 10 avril, dans la veine auriculaire, un tiers d'une culture sur gélose, vieille de 10 jours et délayée dans 3 c. c. de bouillon stérilisé. (La culture provenait du cœur d'une souris ayant succombé à une inoculation avec le microbe de l'ozène, et tuait, à la dose d'une division de la seringue de Pravaz du susdit mélange, en 26 heures, une autre souris pesant 16 grammes). Le lendemain de l'injection, le lapin fut trouvé mort. Le sang pris dans le cœur contenait peu de cocco-bacilles, mais donnait de belles cultures pures du bacille de l'ozène, qui s'y montra encapsulé comme dans tous ces cas.

Un autre lapin (n° 2) reçut le 30 mai, sous la peau du ventre, l'injection d'une culture faite le 11 avril avec le sang du précédent. Il se forma, à l'endroit de la piqûre, un énorme abcès, long de 10 cent. environ, qui suppura pendant des mois. Le pus de cet abcès donna le microbe de l'ozène et des staphylocoques. Le 8 juin, la suppuration continuant, j'injectai dans la cavité abdominale du lapin une petite quantité d'une culture sur gélose provenant du cœur d'une souris tuée par le microbe de l'ozène. La culture était vieille de deux mois. Survie. Le 12 du même mois, le lapin reçut, dans l'abdomen, un demi-centimètre cube d'une culture du sang d'une souris tuée par le même microorganisme, culture vieille de 36 jours. Survie également. Le 16 juin, l'abcès commençait enfin à se cicatriser sous un pansement phéniqué. Un œil était congestionné et suppurait; il fut soumis à des lavages avec une solution d'acide phénique à 1,5 0/0. Le 23 juin, l'abcès se trouvait guéri, et le lapin, dont le poids était descendu à 1,410 grammes, en pesait alors 1,825.

Le 26 juin, il reçut, dans l'abdomen, un centimètre cube, cette fois, d'une culture fraîche (datant du 22 juin). Elle provenait du foie d'une souris tuée par le microbe de l'ozène, et sa pureté était sûre, car elle avait été faite avec une colonie isolée d'une plaque de gélatine. Des portions de la même culture furent injectées à trois autres animaux : 1° au cobaye n° 4 qui en mourut en moins de 20 heures; 2° à une souris témoin qui succomba le quatrième jour, et 3° à la souris (n° 22) vaccinée contre le microbe de l'ozène (v. plus loin), qui survécut en vertu de l'immunité acquise. Le lapin ayant résisté à l'injection d'une forte dose de ce produit extrêmement virulent pouvait donc être considéré, à juste titre, comme vacciné contre le cocco-bacille ozénique, et son immunité a été utilisée, ainsi qu'on le verra tout à l'heure.

Plusieurs autres lapins inoculés, soit dans la veine auriculaire, soit dans la cavité abdominale, ont tous succombé, à l'exception d'un seul, qui a résisté à une injection intraabdominale. Chez ceux tués par l'injection intraveineuse, l'autopsie

montre des hémorrhagies dans le péritoine et dans le parenchyme de presque tous les organes, surtout du poumon et de la rate. Celle-ci et les reins sont gros. Le mésentère montre quelquefois des ganglions tuméfiés. Le sang renferme un nombre variable de cocco-bacilles encapsulés. Il donne, bien entendu, de belles cultures pures.

TOXINES ET VACCINATION

J'ai déjà effleuré dans le chapitre précédent la question de la vaccination qui m'a conduit à l'étude des toxines. J'ai procédé de la façon suivante : Une culture pure du microbe dans du bouillon peptonisé fut faite le 17 avril avec le sang du cœur d'une souris tuée par ce microorganisme. Le lendemain, 18 avril, j'injectai 1/2 c. c. de ce bouillon sous la peau d'une souris grise pesant 13 grammes. Bien portante encore le 19, je la trouvai morte le 20 au matin. Cette culture virulente fut alors chauffée, dans des tubes scellés, pendant une heure à 58°. L'expérience montra qu'elle était devenue stérile; elle fut alors injectée, en proportions diverses, à des souris : une première, pesant 13 grammes, en reçut 1/2 c. c. et mourut le quatrième jour. *Son sang ne contenait aucun microbe et ne donnait pas de cultures. La mort ne pourrait donc être due qu'aux toxines élaborées par le cocco-bacille.* Une autre souris (n° 20), pesant 16 grammes, reçut 13 divisions de la seringue. Mais elle avait été inoculée précédemment avec des portions de différentes cultures chauffées à des températures plus élevées que 58° (100°, 72°, etc.) et les avait bien supportées. Elle survécut aussi à la dernière injection faite avec du bouillon de culture porté à 58° seulement.

Dans le but d'examiner si ces diverses inoculations avaient conféré à la souris en question l'immunité contre le microbe de l'ozène, je lui injectai, six jours après, une portion d'une culture, vieille de deux mois, qui provenait du sang d'une autre souris tuée par le même microorganisme. Une autre (témoin), pesant 18 grammes, fut inoculée avec une quantité, proportionnelle à son poids, de la même culture. Le lendemain, ce témoin avait la respiration précipitée et les paupières collées. L'autre souris fut prise à son tour un peu plus tard, et mourut le 4 juin, tandis

que le témoin succomba le 3. La tolérance à la toxine ne s'accompagnait donc d'aucune immunité sensible vis-à-vis du microbe¹.

On peut pourtant vacciner avec des cultures chauffées contre l'inoculation d'une culture non chauffée. J'ai réussi à cela avec une seule de mes souris, le n° 22, pesant 20 grammes, et qui a supporté une première injection de 1 c. c. d'émulsion de culture chauffée, puis, peu de temps après, une seconde.

Je continuai alors l'expérience, en lui inoculant des cultures *non chauffées* et de plus en plus fraîches, c'est-à-dire de plus en plus actives. Comme suites, il n'y eut que des abcès sous-cutanés aux lieux d'injection.

Le 26 juin, elle reçut enfin une *grande quantité* d'une culture fraîche qui, injectée dans l'abdomen d'un cobaye, n° 4, l'avait tué en moins de vingt heures, de même qu'elle avait été fatale à une souris-témoin (v. plus haut). A la suite de l'inoculation de ce produit extrêmement virulent, il se développa un abcès énorme sur le dos de la souris, à l'endroit de l'injection, et la peau se décolla sur une grande étendue, de façon à laisser à nu une cavité vaste et profonde. Enfin, un grand lambeau cutané, formant comme un couvercle qui avait adhéré longtemps par une petite bride, tomba par suite de sphacèle. La souris fut très-malade et eut l'œil gauche fermé et le poil hérissé. Mais, finalement, l'abcès se ferma, en végétant copieusement, et, vers le milieu de juillet, la souris était tout à fait rétablie.

Elle avait donc résisté à l'injection d'une grande quantité d'une culture des plus virulentes, et possédait alors, par conséquent, l'immunité contre le microbe de l'ozène, fait d'autant plus remarquable que les souris, comme nous l'avons vu plus haut, sont extrêmement sensibles à l'inoculation de ce microbe, dont les plus petites quantités les tuent. En raison de ce dernier fait, juste-

1. Il n'en reste pas moins acquis que les cultures du microbe de l'ozène contiennent une toxine, et, si celle-ci agit sur l'homme comme sur les souris, on est autorisé à attribuer, comme je le faisais en 1884 dans mon opuscule cité, « la santé débile, l'aspect malsain et le teint blafard des ozéneux, non seulement à l'aspiration incessante des produits gazeux que révèle la puanteur de l'haleine, mais aussi à la déglutition des produits non gazeux, parmi lesquels il y en a certainement de fort nuisibles. Ce fait est certain pour moi, depuis que j'ai constaté la présence du cocco-bacille dans les mucosités qui revêtent la paroi postérieure du pharynx, et qui sont certainement avalées de temps en temps » (*Loc. cit.*, p. 12). Il serait intéressant de chercher s'il y a de ce fait des troubles gastriques chez les ozéneux.

ment, j'incline à penser que c'est l'injection des toxines d'abord et des cultures affaiblies ensuite qui a conféré l'immunité à cette souris.

Le lapin n° 2 avait également pu être vacciné contre le microbe de l'ozène.

L'immunité ayant été obtenue chez ces deux animaux, il était intéressant de rechercher si leur sérum pourrait conférer l'immunité contre le microbe de l'ozène. Comme il n'était pas possible de tirer du sang, en quantité suffisante, de la souris, je m'adressai pour cela au lapin vacciné qui supporta parfaitement, le 13 décembre, une abondante saignée à la carotide.

Nourri depuis longtemps au laboratoire, ce lapin était énorme; tandis que son poids primitif avait été de 1 kilog. 600 gr. environ, il pesait vers l'époque que je viens de mentionner, 3 kilog. 215 gr. Le sérum de son sang fut employé de la manière suivante : une souris neuve fut inoculée avec le microbe de l'ozène et, après sa mort, deux tubes de gélose furentensemencés avec son sang. Les cultures ayant bien pris le lendemain, 27 décembre, l'une d'elles (surface râclée) fut injectée, moitié dans la cavité abdominale d'un lapin, moitié dans la veine auriculaire d'un autre. Celui-ci fut trouvé mort le 29 au matin, l'autre déjà le 28 à la première heure. L'extrême virulence de ces cultures étant ainsi prouvée, j'injectai, le 29, un c. c., équivalent à un tiers du second tube, dans la veine auriculaire d'un vigoureux lapin, et immédiatement après, dans la veine de l'autre oreille, 2 c. c. du sérum du lapin vacciné. L'animal inoculé fut assez abattu le lendemain et ne mangea point : il avait une température rectale de 41°,4 : mais le surlendemain il se portait mieux, mangea et n'avait plus que 40°,3. Trois jours après, sa température était de 39°,9. Actuellement, il est complètement rétabli. *L'injection du sérum du lapin immunisé contre le microbe de l'ozène avait donc combattu victorieusement celle d'une culture extrêmement virulente du même microorganisme.*

Dans le but de déterminer la durée de cette immunité chez le lapin vacciné, et la persistance de la propriété immunisante dans le sérum qu'on lui avait tiré, j'ai institué de nouvelles expériences.

Le 14 janvier, une culture fut faite sur gélose, avec une autre ensemencée avec le sang du lapin n° 8, lequel avait succombé le 27 décembre à l'injection intraveineuse du microbe de

l'ozène. La culture fut injectée en entier le 13 janvier dans la veine auriculaire du lapin n° 2 qui avait non seulement été immunisé, mais dont le sérum avait même protégé d'autres animaux contre l'inoculation du même cocco-bacille. Je le trouvai mort le lendemain matin; *l'immunité avait donc de nouveau disparu*, quatorze jours après l'époque où elle avait été constatée : quant au sérum de son sang tiré le 13 décembre, sérum qui vaccinait encore le 29 du même mois (voir plus haut), il en fut injecté le 16 janvier de l'année suivante quatre divisions de la seringue, mélangées avec deux divisions d'une culture faite avec le sang du lapin n° 5, à une souris noire pesant 11 gr. Elle fut trouvée morte le surlendemain matin. *Le sérum avait donc perdu l'effet immunisant qu'il possédait encore dix-huit jours auparavant.*

Après la mort du lapin n° 2 (l'ex-immunisé), plusieurs pipettes de sang lui furent tirées du cœur. Le sérum de l'une fut injecté le 17 janvier à une souris grise pesant 13 grammes et la tua en quatre jours. Le sang de la souris était riche en cocco-bacilles et donnait de belles cultures pures.

Les faits qui précèdent nous apprennent donc que l'immunité que j'avais réussi à conférer au lapin n° 2 avait disparu au bout d'un certain temps, comme également la propriété vaccinante du sérum du sang tiré à cet animal et conservé à la température ordinaire.

Nous pouvons maintenant revenir, par une autre voie, à la question de l'identité entre le pneumobacille et le microbe de l'ozène. Nous avons fait valoir, contre cette identité, des différences dans l'aspect et certaines propriétés des cultures. Mais nous avons maintenant un autre moyen d'épreuve, c'est de voir si l'immunité contre l'un de ces microbes implique l'immunité contre l'autre, et réciproquement.

La virulence du pneumobacille n'ayant guère été éprouvée jusqu'ici que par des injections massives dans le poumon au travers de la paroi thoracique ¹, injections faites pour étudier ses relations avec la production de la pneumonie, j'ai dû, mon objet étant autre, choisir une autre méthode d'expérimentation. J'ai opéré chez la souris par voie hypodermique, en profitant de ce que le tissu sous-cutané, très lâche sous la peau du dos,

1. Voir à ce sujet C. FRAENKEL, *Grundriss d. Bakterienkunde*, 3^e édition, 1893, pages 413 et 277.

permet d'introduire en ce point, sans occasionner une plaie sérieuse, des quantités relativement énormes de liquide.

En inoculant ainsi des cultures anciennes, on obtient assez facilement des souris qui survivent, mais qui ne sont pas vaccinées contre l'inoculation de cultures rajeunies sur gélose. Ainsi une de ces souris (n° 14), qui avait supporté l'injection d'une vieille culture, fut inoculée en même temps qu'une souris témoin, avec une culture du pneumobacille sur gélose datant de la veille. Le témoin n° 15 survécut, alors que la souris qu'on aurait pu croire vaccinée mourait en 40 heures.

Le 17 avril, expérience analogue : deux souris furent inoculées, le témoin n° 15 de l'expérience précédente, et une souris neuve, témoin n° 16. Elles reçurent chacune *une grande quantité d'une culture fraîche* provenant du sang pris dans le cœur du n° 14, culture nécessairement très active par sa fraîcheur et par le fait du passage du microbe par le corps d'un animal. L'inoculation, faite un peu brutalement, causa de grands délabrements à la souris n° 15. Aussi, immédiatement après, était-elle dans un grand état de prostration, tenant les yeux fermés. Mais, le 18 avril, elle était complètement rétablie, et résista finalement à cette nouvelle et grave inoculation. *Cette souris possédait donc l'immunité contre le pneumobacille.* Par contre, le n° 16 (témoin) mourut le 25 avril. Elle portait au ventre une énorme escharre à laquelle adhérait l'intestin grêle.

Possédant maintenant une souris qui présentait l'immunité contre le bacille de Friedlaender, je profitai de l'occasion pour examiner si cette propriété implique l'immunité à l'égard du microbe de l'ozène. A cet effet, je lui injectai, le 27 avril, six divisions d'une culture de ce dernier microorganisme (provenant du sang de la souris n° 17, qui avait été tuée en deux jours par une injection du même cocco-bacille cultivé dans du bouillon). Le lendemain, je la trouvai morte ; *l'immunité contre le pneumobacille ne l'avait donc pas protégée contre le microbe de l'ozène.*

On ne peut donc croire à l'identité des deux microbes, ni penser que le microbe de l'ozène est un pneumobacille atténué. Mais il reste une hypothèse que personne, il est vrai, n'a encore faite, c'est que le microbe de l'ozène serait au contraire un pneumobacille exalté. Pour l'examen de cette hypothèse, il fallait retourner l'expérience qui précède, et rechercher si un

animal vacciné contre le bacille de l'ozène résisterait au bacille de Friedlaender.

La sensibilité des souris vis-à-vis du cocco-bacille est telle qu'il ne semblait pas facile de leur conférer l'immunité à son égard.

J'y suis cependant parvenu chez la souris n° 22, ainsi que je l'ai déjà dit incidemment plus haut. Le 14 juillet, lorsque l'abcès du dos était cicatrisé, j'injectai à cette souris la moitié de la seringue de Pravaz d'une culture fraîche de pneumobacille, qui provenait du sang d'une autre souris (n° 16) tuée par l'inoculation de ce microbe. Un autre témoin (n° 26) reçut l'autre moitié du contenu de la seringue. Le lendemain, toutes les deux étaient somnolentes. Le témoin eut la respiration précipitée, l'autre était calme. Le 17 juillet, le témoin eut l'œil gauche fermé et chassieux. Le 21 du même mois, les yeux du n° 22 (l'ancienne) étaient clos, et le lendemain je la trouvai morte. L'autre souris (n° 26) vivait encore le 3 août; ses yeux étaient clairs, mais la dyspnée continuait. J'ai appris, à mon retour des vacances, que cette souris a succombé le 7 septembre. Je n'ai pu avoir aucun détail sur la cause de sa mort.

L'autopsie de la souris n° 22 (vaccinée contre le microbe de l'ozène), montra, comme c'est la règle chez les animaux tués par celui-ci ou par le pneumobacille, les poumons sains, d'un beau rose et surnageant sur l'eau. Les préparations microscopiques et les cultures du sang montraient le cocco-bacille de Friedlaender en abondance. A la peau du ventre on voyait plusieurs escharres assez étendues.

La vaccination contre le microbe de l'ozène n'avait donc pas protégé la souris contre celui de Friedlaender; nouvelle preuve de la non-identité de ces deux microbes ¹.

CONCLUSIONS

Les expériences décrites dans les derniers chapitres nous autorisent à formuler les conclusions suivantes :

1° *Le microbe de l'ozène n'est pas identique au pneumobacille, dont il ne constitue ni une forme atténuée ni exaltée.*

2° *Le cocco-bacille de l'ozène que j'ai décrit en 1884 est un microbe*

1. Je me vois obligé de me borner à cette expérience unique, n'ayant réussi à conférer qu'à une seule souris l'immunité contre le microbe de l'ozène.

sui generis et propre à l'affection en question. Il se trouve, dans tous les cas de cette maladie, en masses énormes et la plupart du temps sans qu'une autre espèce soit présente¹. Enfin ce microbe n'a encore été rencontré que chez les ozéneux; sa présence constante dans une maladie aussi nettement caractérisée quant à ses lésions et à l'odeur qu'elle produit — et dans cette maladie seule — démontre, à mon sens, que celle-ci et le microbe s'impliquent mutuellement.

Il est vrai que je n'ai pas réussi à reproduire dans mes cultures l'odeur caractéristique de l'ozène, mais j'ai discuté plus haut cette objection. Il y a à ce sujet un nouveau progrès à réaliser, et les faits acquis n'en restent pas moins acquis.

Il est vrai aussi que je n'ai pas réussi à reproduire l'ozène sur des animaux par l'introduction de mes cultures dans le nez; mais ce reproche s'applique à tant de travaux de microbiologie que ce n'est plus la peine de le soumettre à une discussion.

3^e *Le microbe de l'ozène est extrêmement pathogène.* La découverte de son existence n'apprend donc pas seulement un fait bactériologique nouveau, mais révèle en outre la présence, dans le corps des ozéneux, d'un être capable d'exercer une action redoutable, sous condition que l'entrée des vaisseaux sanguins ou lymphatiques lui soit ouverte. Non seulement la surface interne des fosses nasales, encore agrandie par celle des cornets, le loge en masses innombrables, mais il déborde jusque dans les cavités adjacentes, par exemple, le pharynx nasal et, dans certains cas, même le larynx.

Toute blessure de la muqueuse pourrait donc lui créer une porte d'entrée. Ce danger possible nous impose l'obligation d'éviter, dans le traitement de l'ozène, toute manipulation capable de blesser la muqueuse et d'ouvrir ainsi au microbe les voies lymphatiques ou sanguines, surtout les veines qui sont extrêmement serrées, particulièrement au cornet nasal inférieur, où elles forment comme un tissu caverneux.

4^e *Comme conclusion accessoire*, j'ajouterai que, si le microbe de l'ozène est toujours pathogène, le pneumobacille, tout en présentant une certaine variabilité à cet égard, n'en possède

1. Je viens de découvrir, dans un cas d'ozène, la présence constante de grandes masses d'un *vibron* à côté du cocco-bacille spécial. Je me réserve de revenir sur cette curieuse association, dès que j'aurai terminé l'étude du vibron en question.

pas moins une sérieuse puissance pathogène pour les souris.

APPENDICE. — Sur le point de terminer ce mémoire, j'ai eu connaissance d'un excellent travail publié par M. Abel dans le *Centralblatt f. Bakteriologie, etc.*¹, dont les résultats concordent en général avec les miens, et qui, tout en confirmant la description déjà ancienne du microbe que j'ai découvert dans l'ozène, m'a donné connaissance des résultats de M. Ch. Hope, de Campos Sales, Valentin, Berliner et Reimann. Tous ces savants, à l'exception du dernier, confirment l'existence du cocco-bacille, mais diffèrent d'opinion sur son rôle. M. Abel seul partage complètement mon opinion, et le regarde comme caractéristique de l'ozène².

Il l'a vu prépondérant dans tous les cas de la maladie; mais tandis que je l'ai rencontré *pur* dans la très grande majorité de mes nombreuses cultures sur plaques, il ne l'a trouvé seul présent que dans quatre cas sur seize. Par contre, il ne l'a jamais vu dans le mucus de vingt nez sains ou atteints d'autres affections que l'ozène. Pour lui, la capsule n'existe pas toujours³.

Il n'insiste guère sur les odeurs de la culture sur divers milieux. Il dit seulement, à ce sujet: « le bacille donne sur tous les milieux une odeur particulière, difficile à définir, et ressemblant peut-être le plus à celle du malt en fermentation ». Il a vu quelques gaz se dégager dans les cultures sur gélose et sur gélatine, mais jamais sur la pomme de terre. Je n'ai constaté ce fait sur aucun de ces milieux de culture.

Les résultats de mes inoculations aux souris et aux cobayes concordent avec les siens jusque dans le nombre des jours de survie de ces animaux. M. Abel ajoute, ensuite, que dans le sang des animaux tués par l'inoculation du microbe de l'ozène, ce cocco-bacille ne se montre pas trop souvent encapsulé; cela est en contradiction absolue avec mes nombreuses observations, qui me l'ont pour ainsi dire toujours montré encapsulé dans le sang. M. Abel affirme en outre que le lapin résiste à toute inoculation de l'ozène. A une seule exception près, tous les lapins aux-

1. Bakteriologische Studien ueber Ozaena simplex, l. c. XIII, p. 461-473.

2. Comme sa description concorde avec la mienne datant de 1884, je ne vois pas bien pourquoi M. Abel lui donne le nom nouveau de *Bacillus mucosus ozaenae*.

3. Je dirai en passant que M. Abel, le premier, a reconnu ma priorité quant à la découverte de cette capsule.

quels je l'ai injecté, en sont, au contraire, morts, et cela dans des délais quelquefois très courts.

L'auteur dit ensuite que « les souris succombent toujours au microbe de l'ozène, et non pas à celui de Friedlaender, fait signalé aussi par Pfeiffer ». Or, mes expériences, relatées dans un des chapitres précédents, contredisent absolument l'affirmation de ces deux auteurs, quant à l'innocuité présumée du pneumobacille pour les souris.

M. Abel affirme ensuite que l'odeur causée par l'ozène ne diffère pas de celles dues à d'autres affections intranasales, par exemple des processus syphilitiques. Nous avons vu plus haut que la nécrose par syphilis tertiaire du nez, par exemple, exhale un foetor tout à fait différent de celui de l'ozène vrai. Il est à supposer que l'auteur, qui n'est pas spécialiste, que je sache, ne possède pas d'expérience suffisante sur ce terrain, réservé plutôt au rhinologiste.

Enfin, en discutant la question de la contagiosité de l'ozène, M. Abel dit textuellement ceci : « Je n'ai pas trouvé l'occasion d'essayer l'inoculation du bacille à l'homme. »

Je ne pense pas que l'on ait le droit de faire de telles expériences : mais peut-être pourrait-on le tenter dans un but thérapeutique, et essayer de combattre par l'ozène, affection, certes, des plus fâcheuses, mais non dangereuse, une maladie comme le *rhinosclérome*, qui peut devenir mortelle, car l'épaississement caractéristique pour cette affection ne se borne pas à la peau et à la muqueuse du vestibule des fosses nasales et de la lèvre supérieure, mais peut obstruer les orifices antérieur et postérieur du nez, et surtout le larynx, et amener de cette façon la mort par suffocation.

Or, si le rhinosclérome est une maladie hypertrophiante, l'ozène est essentiellement atrophiant, et les deux affections sont caractérisées par des bacilles qui présentent entre eux les plus grandes ressemblances. *Il y aurait donc peut-être lieu d'essayer dans le rhinosclérome, surtout à son début, l'introduction au niveau des parties atteintes de la muqueuse, du microbe de l'ozène, dans le but d'opposer le pouvoir raréfiant de celui-ci à l'action hypertrophiante du rhinobacille.*

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES TOXINES DU CHOLÉRA

PAR LE D^r F. F. WESBROOK,

JOHN LUCAS WALKER STUDENT IN PATHOLOGY, A CAMBRIDGE

(Travail du laboratoire de pathologie de l'Université de Cambridge.)

Nos connaissances sur la chimie pathologique des maladies contagieuses se sont accrues constamment, depuis que Brieger¹ a publié ses recherches sur les ptomaines, mais c'est là encore un sujet plus ou moins enveloppé de mystère. Brieger a conclu que c'étaient les toxines spécifiques produites par la multiplication des microbes pathogènes dans les tissus. Par la découverte d'Hankin² sur une albumose toxique dans les cultures de charbon; par les nouveaux progrès faits surtout par Brieger et Fraenkel³, Sidney Martin et autres savants, une nouvelle lumière fut projetée sur la chimie des procès infectieux, et on admit que les principes toxiques appartenaient aux albumines plutôt qu'aux ptomaines ou aux substances basiques.

Les corps albumineux, isolés par certains savants, réagissaient les uns comme des albumoses ou des peptones, les autres comme des globulines ou des albumines, et portaient par suite le nom général de toxalbumines. On trouvait ces substances, non seulement dans les produits du métabolisme des microbes cultivés dans les milieux de culture ordinaires ou légèrement modifiés, mais aussi dans les tissus, ainsi que l'ont spécialement montré les recherches de Sidney-Martin⁴ sur l'anthrax et la diphtérie.

La conclusion générale de ces observations fut que les

1. BRIEGER, *Berlin. Klin. Woch.*, 1886, p. 284; 1887, p. 314-317, 1888, n° 17 Untersuchungen über Ptomaines, Berlin, 1885 and 86.

2. HANKIN, On Immunity produced by an Albumose isolated from Anthrax Cultures. (*British Medical Journal*, Oct. 12th, 1889.)

3. BRIEGER UND FRAENKEL, *Berlin. Klin. Woch.*, pp. 241-248, 1890.

4. SIDNEY MARTIN, Preliminary Report on the chemical Products of the life processes of Bacillus Anthracis (49th Annual Report of the Medical Officer to the Local Government Board, p. 235, 1889-90), et The Chemical Products of the growth of the Bacillus Anthracis and their physiological Action (*Proceedings of the Royal Society of London*, May 22nd, 1890, et 21st Annual Report of the Medical Officer to the Local Government Board, p. 170).

microbes pathogènes produisent leurs lésions spécifiques par le moyen de produits albumineux, formés aux dépens des protéïdes du corps de l'animal, et que, dans la formation de ces produits, le microbe agit comme une diastase ou sécrète un corps diastatique. Mais tous ceux qui acceptent la notion des toxalbumines s'accordent sur ce point que les produits spécifiques finaux sont des albumines.

Cette conception rencontra de l'opposition, spécialement de la part de Duclaux ¹ et de Dzierzowski et de Rekowski ².

Le premier critiqua le manque d'une bonne méthode chimique, et exprima ses doutes sur la nature albumineuse de ces corps, qu'il considérait comme distincts et différents des albumines, albumoses, peptones ou globulines, et comme probablement entraînés mécaniquement avec ces substances, pendant le procès de précipitation par l'alcool, le sulfate de magnésium ou les autres précipitants employés. Duclaux cependant n'exprima pas d'opinion sur la nature exacte de ces toxines. Dzierzowski et de Rekowski arrivèrent aux mêmes conclusions, revinrent à l'idée originelle de la nature alcaloïdique de ces corps, et crurent que ces toxines alcaloïdiques n'étaient pas seulement mêlées mécaniquement avec les précipités protéïques, mais contractaient avec eux une combinaison chimique plus ou moins stable, analogue à celle des alcali-albumines.

De leur côté, Roux et Yersin ³, travaillant sur la diphtérie, isolèrent une substance qu'ils classèrent parmi les diastases.

Ces obscurités n'ont pas été éclaircies par le récent travail sur la diphtérie de Sidney Martin ⁴, dont nous avons parlé. Il trouva dans les membranes diphtéritiques un corps, analogue à une diastase par sa nature, qui produit les mêmes effets physiologiques que les albumoses, mais possède une plus grande activité. Il pense que « cette diastase, une fois absorbée, digère les protéïdes des corps en formant des albumoses, et que ce sont

1. DUCLAUX, *Annales de l'Institut Pasteur*, p. 380, 1890.

2. DZIERZGOWSKI et DE REKOWSKI, Recherches sur la transformation des milieux nutritifs par les bacilles de la diphtérie et sur la composition chimique de ces microbes, (*Archives des Sciences Biologiques à Saint-Petersbourg*, 1892, t. I, n° 1 et 2; p. 166-197.)

3. ROUX et YERSIN, *Annales de l'Institut Pasteur*, p. 273-288; 1889, et p. 629-661, 1888.

4. SIDNEY MARTIN, *21st Annual Report of the Medical Officer to the Local Government Board*, p. 170.

ces produits de digestion qui amènent la mort, causent la fièvre et la dépression, aussi bien que la paralysie qui est consécutive à la diphtérie ».

Plus récemment Buchner¹ et Uschinsky² ont repris à nouveau tout le sujet, et, pour la séparation des substances toxiques, ils ont évité les milieux de culture contenant de l'albumine ou des corps albumineux.

Ils ont trouvé que, dans des solutions d'asparaginate de soude, les germes pathogènes poussent vigoureusement sans perte de virulence, et que les principes toxiques qu'ils fabriquent alors ne donnent plus la réaction des albumoses, et à peine la réaction typique des albumines, de sorte qu'ils les désignent sous le nom vague de diastases et substances albuminoïdes. Il est possible que ces diastases, injectées dans le corps de l'animal, digèrent les protéïdes des tissus en formant des albumoses à la manière de la diastase diphtérique, mais dans l'état actuel de nos connaissances, c'est là une simple spéculation ayant besoin de nouvelles recherches pour être confirmée.

En somme il semble que depuis Brieger, les noms donnés par divers savants à ces diverses toxines ont changé suivant le milieu de culture ou la méthode d'extraction. Cela m'a frappé, engagé que j'étais depuis quelques mois dans des recherches sur les albumoses³ formées par le *Bacillus Anthracis*, et il m'a semblé utile de reviser toute la question. Pour cela, le vibron du choléra semblait particulièrement favorable. Ses toxines ont été décrites comme des peptones, des globulines, des albumoses et des alcaloïdes: leur nature, d'après mes observations, semblait varier avec la méthode de recherche, et en songeant combien sont incomplètes nos connaissances chimiques sur les substances protéïques et albuminoïdes, on comprend combien il est hasardeux de donner un nom définitif aux toxines. Il semble donc que le meilleur moyen d'arriver à de moins fallacieux résultats est celui qu'a employé le premier Uschinsky⁴, et je me con-

1. BUCHNER, *Münchener Med. Woch.*, 1893. Nov. 24, p. 449 v. 452, and Nov. 25, p. 480-483.

2. USCHINSKY, *Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde*, Sep. 9th, 1893.

3. HANKIN AND WESBROOK, Sur les Albumoses et les Toxalbumines sécrétées par le bacille charbonneux. (*Annales de l'Institut Pasteur*, 1892, p. 633-650.)

4. USCHINSKY, *Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde*, XIV, 10, pages 316-319.

sidère comme heureux d'avoir pu utiliser cette méthode, lorsque ce travail était déjà à peu près terminé.

Dans presque tous les cas on s'est servi du *Vibrio Cholerae Asiaticæ* (Virus Fort : Haffkine), que M. Haffkine a eu la complaisance de me fournir.

La culture du vibron a été faite dans les milieux suivants :

- a) Alkali-albumine (préparée par la méthode de Sidney Martin)¹ ;
- b) Œufs (méthode de Hueppe)² ;
- c) Solutions de peptones ;
- d) Solution d'asparaginate de sodium (méthode d'Uschinsky)³.

Dans la plupart des cas, les cultures étaient aérobies ; elles ont été anaérobies dans les autres.

On a fait ensuite l'étude chimique des cultures, et on a essayé physiologiquement et comparé les unes aux autres les substances toxiques séparées. On a examiné aussi la relation de ces substances avec la production de l'immunité.

On a étudié de la même façon l'exsudat péritonéal des animaux tués par injection des cultures de vibrions.

On trouvera dans chaque section tous les détails sur l'emploi de chaque méthode.

I

POISONS CHIMIQUES DE LA CULTURE DU VIBRION DANS L'ALKALI-ALBUMINE

Comme on a, jusqu'ici surtout, étudié les toxines des cultures du comma-bacille dans les peptones commerciales ou les milieux peptonisés, il m'a semblé bon d'éviter la présence de toute substance donnant la réaction du biuret, et c'est pour cela que j'ai choisi l'alkali-albumine de Sidney Martin.

1. SIDNEY MARTIN : « Preliminary Report on the chemical Products of the life processes of Bacillus Anthracis. » (19th Annual Report of the Medical Officer to the Local Government Board ; 1889 and 1890.)

2. HUEPPE : « Sur l'emploi des œufs comme milieu de culture. » (Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde ; Bd. V, 1888, p. 80.)

3. USCHINSKY, Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde, XIV, 10, pages 396-319,

J'ai traité le sérum (de bœuf ou de mouton) centrifugé, par la méthode de Martin, sauf que, au lieu de filtrer après neutralisation, j'ai laissé se déposer au fond du vase l'albumine précipitée et j'ai siphonné le liquide qui la surnageait.

On a rajouté de grandes quantités d'eau distillée, en agitant vigoureusement avec un bâton de verre, et cette opération plusieurs fois répétée a paru préférable à un lavage sur filtre.

Le précipité ainsi lavé a été dissous dans une solution de soude caustique et dilué avec l'eau distillée, de sorte que pour 500 c. c. du sérum originel, on a eu trois litres de solution d'alcali-albumine, contenant 0,1 0/0 d'hydrate de sodium et 0,25 0/0 de chlorure de sodium.

On a filtré à clair le liquide qui a été mis en flacons (500 c. c. dans chacun) et stérilisé à l'autoclave ou par des ébullitions répétées, à des jours successifs, dans un stérilisateur à vapeur.

On a obtenu finalement un liquide clair, légèrement jaunâtre, ne donnant aucune coloration rouge avec le sulfate de cuivre et la potasse caustique, mais qui, lorsqu'on neutralisait sa légère alcalinité, fournissait un coagulum dense et blanc, que faisait disparaître l'addition d'un acide ou d'un alcali dilué. Dans un ou deux cas, on a ajouté des traces de phosphate de sodium.

Les flacons étaient ensuite inoculés avec des vibrions du choléra (virus exalté Haffkine) et placés à l'étuve à 35° où ils restaient trois ou quatre semaines. Au bout de ce temps, on ne voyait plus de comma-bacilles typiques, mais seulement des formes de coccus. La pureté des cultures a toujours été contrôlée par des plaques et des ensemencements nouveaux.

A. Albumoses dans le liquide de culture.

Les cultures filtrées au travers de la porcelaine ont fourni un liquide ambré très limpide, légèrement alcalin, et donnant nettement la réaction du biuret.

On l'a soigneusement neutralisé avec HCl étendu et, après l'avoir séparé par filtration du précipité formé, on l'a mis dans un flacon stérile, et évaporé presque à siccité dans le vide à 40°, en ajoutant de temps en temps de l'alcool pour éviter la putréfaction.

La masse visqueuse obtenue a été laissée pendant quelques

jours avec 100 à 200 c. c. d'alcool absolu, et lavée dans de nouvelles quantités du même liquide.

Le résidu lavé a été alors dissous dans quelques centimètres cubos d'eau distillée, et dialysé dans de grandes quantités d'eau distillée fréquemment renouvelée, le tout étant maintenu au froid et dans l'obscurité; après 36 ou 48 heures, on enlevait le contenu du tube de parchemin, on filtrait et on concentrait à nouveau dans le vide à 40°. La matière avait alors les réactions suivantes :

- 1° Par saturation avec le sulfate d'ammonium, dense précipité blanc;
- 2° Par saturation avec le chlorure de sodium, léger précipité blanc; mais quand on filtrait et qu'on rendait le liquide acide par l'acide acétique, nouveau précipité blanc, dense;
- 3° Chaleur, aucun effet visible;
- 4° Réaction nette du biuret.

Ce produit final, après dialyse, semblait donc contenir une petite quantité de proto-albumose, avec une plus grande quantité de deutéro-albumose : c'est ce mélange qu'on a inoculé. Il contenait toujours de l'alcool ou du thymol, ajoutés pour assurer sa conservation, mais il était facile de l'en purifier avant l'injection en le plaçant dans le vide à 40°.

Il a permis non seulement de produire des effets toxiques, mais aussi, à plus faible dose, de produire l'immunité contre des doses mortelles du vibrion de choléra chez les cobayes.

Effets toxiques de l'injection d'albumoses chez les cobayes. — La solution aqueuse d'albumoses fut injectée sous la peau des flancs ou de l'abdomen, à des doses variant de 0,5 à 1,5 c. c. de la solution saturée. Quoique on eut pour objet de produire l'immunité contre une ultérieure injection de vibrions, en donnant ces doses à des séries de quatre animaux, trois périrent après douze, quarante et cinquante heures. Un examen bactériologique et microscopique du sang, de l'exsudat péritonéal, de la rate et du point d'inoculation n'a jamais révélé de développement de microbes.

On dilua alors la solution à la moitié de sa force originelle et on donna les mêmes doses de dilution à six animaux, sur lesquels deux succombèrent. Les quatre autres, et le survivant de la première expérience, furent étudiés pour leur immunité contre des cultures vivantes.

Effets immunisants des injections sous-cutanées d'albumoses. — Une semaine après l'inoculation, les quatre survivants furent

soumis à l'action de doses mortelles de bacilles du choléra très virulents, provenant d'une culture de douze heures, en tube incliné, sur sérum coagulé. La culture raclée avait été mise en suspension dans du bouillon, dans un vase stérile, et bien agitée, de sorte que chaque animal recevait la même quantité de la même matière. Les injections furent faites dans le péritoine. Trois des quatre animaux montrèrent un haut degré d'immunité et survécurent, pendant que les animaux de contrôle mouraient en trois heures et demie, sept heures et neuf heures. Le quatrième animal vacciné mourut pendant la nuit, quelques heures après les témoins, et, à l'autopsie, son liquide péritonéal fut trouvé plein de cellules avec peu de bacilles, tandis que dans les témoins, il y avait des masses de bacilles et très peu de cellules. Le seul survivant de la première expérience avec la toxine concentrée fut aussi trouvé doué de l'immunité, au bout d'une semaine, à une dose qui fut fatale au témoin et le tua avec les symptômes et les désordres ordinaires.

Ces expériences montrent clairement à la fois le pouvoir toxique et immunisant des albumoses.

Il est inutile de donner des détails sur d'autres séries d'expériences du même ordre. Elles ont prouvé que des injections sous-cutanées d'albumoses, préparées comme ci-dessus, peuvent donner l'immunité contre des injections intra-péritonéales du bacille-virgule vivant.

Albumoses préparées par précipitation avec le sulfate d'ammonium.
— On a obtenu les mêmes résultats avec des albumoses préparées par saturation avec le sulfate d'ammonium.

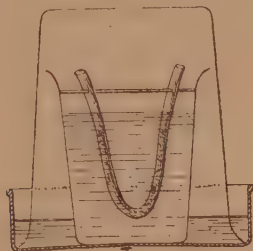
La méthode de préparation était celle d'Hankin, sauf que, après filtration sur la porcelaine, l'alcali-albumine non encore digérée était précipitée par neutralisation, et séparée par le filtre : sans cela elle se fût précipitée au moment de la saturation par le sel.

B. *Le liquide de dialyse des albumoses.*

Dans deux séries d'expériences, la dialyse a été prolongée dans la même eau distillée; une fois pendant soixante-douze heures, l'autre fois pendant une semaine.

Il a fallu pour cela éviter la putréfaction, en mettant le vase

au froid et en ajoutant de temps en temps l'alcool au liquide, à l'intérieur et à l'extérieur de la membrane dialysante¹.



Le liquide de dialyse a été concentré dans le vide à 40°. Il donnait les réactions suivantes :

1° Réaction distincte du biuret;

2° Léger précipité par saturation avec le sulfate d'ammonium ou le chlorure de sodium.

Il semblait donc formé de peptone, avec une trace d'albumose, qui se dialyse moins faiblement que la peptone.

Action sur les cobayes. — Il a été impossible d'obtenir cette substance en quantité suffisante pour lui faire produire des effets toxiques, mais en inoculant comme à l'ordinaire par voie sous-cutanée, on a vu qu'elle avait un pouvoir immunisant. Dans presque tous les cas, les animaux inoculés ont supporté des injections intra-péritonéales du microbe vivant, qui tuaient les cobayes de contrôle avec les symptômes ordinaires, dans des temps variant de huit à vingt-quatre heures. Là où l'immunité n'était pas complète, les animaux traités manifestaient un degré de résistance marqué par le délai de leur mort et la présence d'un plus grand nombre de cellules dans le liquide péritonéal, à l'autopsie. Les témoins mouraient toujours avant l'animal traité et ne montraient pas les mêmes preuves de résistance cellulaire dans l'exsudat péritonéal.

1. L'appareil ci-dessus rend facile une dialyse prolongée dans des conditions aseptiques. Un tube de verre, attaché si c'est nécessaire, soutient un tube de parchemin rempli de la solution d'albumoses et plongeant dans de l'eau distillée stérilisée. Sur ce premier vase en est renversé un second, dont les bords plongent dans une solution de sublimé. L'appareil qui ressemble à une grande boîte de Pétri est stérilisé à l'autoclave, avec le milieu de dialyse.

On enlève le couvercle pour introduire dans le tube de parchemin, avec une pipette stérilisée, le liquide à dialyser.

C. Précipité par neutralisation.

Il restait maintenant à étudier le précipité obtenu en neutralisant les cultures filtrées de l'origine. La quantité en variait suivant l'âge de la culture, diminuant constamment, mais n'étant jamais nulle; l'expérience a été faite trois fois par les mêmes méthodes et avec les mêmes résultats. Il suffira d'en décrire une.

Une culture de treize jours sur alcali-albumine a été filtrée sur porcelaine et ne donnait plus ensuite, par neutralisation, qu'un faible précipité. Le filtre a été ensuite lavé avec une solution à 5 0/0 d'hydrate de sodium, et le liquide de filtration limpide, presque incolore, donna par neutralisation soigneuse avec HCl dilué, un abondant précipité blanc.

Ce précipité fut réuni sur un filtre et abondamment lavé, pendant deux heures, avec de l'eau distillée, jusqu'à ce que la filtration fut incolore et ne donna plus la réaction du biuret. Il fut ensuite dissous dans une petite quantité d'eau distillée, légèrement alcalinisée par de la soude caustique, et filtré à nouveau, de façon à fournir un liquide qui ne donnait pas la réaction du biuret, mais qui fournissait par précipitation un copieux précipité floconneux blanc. Ce précipité semblait ne pas contenir de peptones ou d'albumoses, mais était probablement de l'alcali-albumine non digérée pendant la culture. Il peut y avoir eu de l'anti-albumose, mais ses réactions sont celles de l'alcali-albumine, et il n'y a moyen de l'en distinguer que par la digestion.

Ce précipité purifié, en solution claire et faiblement alcaline, a servi pour des injections sous-cutanées au cobaye.

Je n'ai pas eu assez de matière pour amener la mort, mais les doses inoculées ont donné un degré marqué d'immunité contre une inoculation intra-péritonéale ultérieure, faite avec des cultures vivantes et virulentes qui, aux mêmes doses, tuaient sûrement en quelques heures les animaux de contrôle.

Il y avait donc là une substance qui, sans donner les réactions des peptones ni des albumoses (si nous en exceptons les anti-albumoses), était pourtant capable de donner, autant que les albumoses, une immunité contre le virus vivant.

II

POISONS CHIMIQUES DU VIBRION DU CHOLÉRA CULTIVÉ DANS LES ŒUFS

Les recherches de Scholl ¹ sur les toxines produites par les bacilles du choléra cultivés dans les œufs, présentaient comme possible la préparation d'une toxine assez puissante et assez abondante pour se prêter à une purification complète.

Ce savant dit avoir obtenu une substance contenant des peptones, et qui, inoculée dans le péritoine de cobayes à la dose de 5 c. c., les tuait en quelques minutes. Il a aussi isolé une globuline presque aussi puissante. Il a vu enfin que 4 c. c. de la culture dans l'œuf, âgée de trois semaines, pouvaient amener la mort de l'animal en quinze minutes.

Pour obtenir des toxines semblables, on a inoculé des œufs frais comme le faisait Hueppe, et, après les avoir couverts d'une couche de collodion, on les a mis à l'étuve à 35° pendant trois semaines, après quoi on a éprouvé la pureté et la virulence de la culture. Sauf un petit nombre de coagulums noirs, le contenu des œufs était devenu liquide et ils répandaient l'odeur typique des cultures de choléra.

L'inoculation intra-péritonéale de doses de 1 à 7 c. c., a donné les symptômes suivants chez des cobayes :

1° Collapsus immédiat et chute de la température au-dessous de 35° dans l'intervalle de treize minutes à deux heures : cette basse température persiste et se prononce de plus en plus jusqu'à la mort ;

2° Tremblement dans les membres et crampes abdominales ressemblant à des tentatives de vomissement ;

3° Salivation dans quelques cas ;

4° Mort après un intervalle variant de sept à vingt-huit heures, mais jamais après quinze minutes, car même des doses de 6 à 7 c. c. n'ont jamais amené la mort en moins de sept à dix heures.

C'est peut-être à cause de différences dans les cultures que mes produits étaient moins virulents que ceux de Scholl. Je me suis toujours servi du *virus exalté* de Haffkine.

Des inoculations sous-cutanées de 0,5 à 1 c. c. ne tuaient pas d'une façon sûre ; mais, quand l'animal mourait, il y avait une élévation temporaire de la température, suivie en quelques

1. SCHOLL, Untersuchungen über giftige Eiweisskörper bei Cholera asiatica und einigen Faulniss-processen. (*Archiv. für Hygiene* ; XV, 1892 ; p. 172-215.)

heures d'une dépression graduelle jusqu'à la mort. Dans tous les cas mortels, l'autopsie révéla des masses de vibrions qui avaient pénétré dans le péritoine, la mort étant la conséquence de cette infection.

Les toxines ont été extraites à la façon ordinaire, en mettant les œufs dans l'alcool absolu où on les laissait quelque temps¹; on réunissait alors le précipité et on le lavait sur un filtre jusqu'à ce que le liquide passé n'eût plus aucune couleur jaune.

En faisant l'extraction par l'eau distillée et en agitant quelques heures, ce précipité donnait une solution blanche que des filtrations répétées ne rendaient pas limpide. Cette solution alcaline donnait les réactions suivantes :

- 1° Très légère réaction du biuret ;
- 2° Fort précipité blanc par la chaleur, dû probablement à la globuline que l'alcool n'avait pas coagulée ;
- 3° Fort précipité blanc par saturation avec le sulfate d'ammonium ou le chlorure de sodium.

Ce mélange impur produisit des symptômes toxiques prononcés par injection à dose suffisante dans le péritoine de cobayes : collapsus immédiat, chute de la température, crampes, parfois salivation. La mort survint au bout de quatre à dix heures. A plus faible dose, l'inoculation amena une immunité marquée contre une inoculation ultérieure.

L'impossibilité d'obtenir des solutions claires et la nécessité d'employer de fortes doses rendaient si incertaine la tâche de séparer la toxine qu'on y a renoncé.

III

CULTURES ANAÉROBIES

Pour obtenir des toxines plus puissantes que les précédentes, on a essayé des cultures anaérobies, suivant la méthode de Ilueppe et Scholl; on a opéré de la façon suivante :

- 1° On a étiré le col d'un flacon rempli d'un milieu de

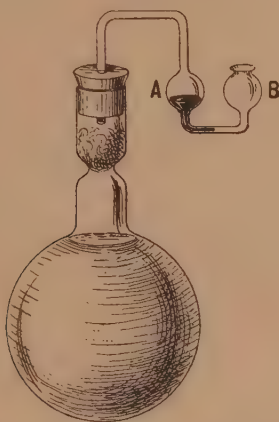
1. Les œufs qui ont été laissés six semaines au contact de l'alcool sont devenus si insolubles qu'il ne s'en dissolvait plus que très peu dans l'eau distillée, et cet extrait aqueux ne donnait les réactions ni des peptones ni des globulines, mais seulement une faible réaction xanthoprotéique. Il était sans action, quand on l'injectait aux cobayes.

culture stérilisé et ensemencé avec le bacille du choléra. On a ensuite fait le vide par le moyen d'une pompe de Sprengel, l'ébullition se produisant à 37°. On a alors fermé à la lampe;

2° Dans d'autres cas on a remplacé l'air des flacons par de l'hydrogène et on a fermé le vase comme ci-dessus;

3° On a aussi scellé les tubes et flacons sans en extraire l'air, qui perdait peu à peu son oxygène, les microbes s'habituant ainsi peu à peu à la vie anaérobie¹.

Au bout d'un à trois jours, il y avait à la surface du liquide une légère couche qui restait bientôt stationnaire. On a démontré



comme il suit que cet arrêt de croissance était dû à l'absence d'oxygène.

Le col d'un flacon contenant du bouillon, de la peptone, de l'alcali-albumine ou tout autre liquide nutritif a été étiré, fermé par un tampon de coton et stérilisé à l'autoclave; après l'avoir ensemencé avec le bacille virgule, on a poussé le tampon contre l'étranglement et on a adapté un bouchon de caoutchouc muni d'un tube à boules A², contenant un peu de mercure.

En plaçant le tout à l'étuve, il y a eu d'abord une augmentation de pression due à la chaleur; mais, après vingt-quatre à quarante-huit heures, le mercure témoignait d'une forte pres-

1. J'ai vu dans un cas de culture dans la peptone commerciale, où le tampon avait été couvert d'une couche de paraffine, ce tampon être aspiré le long du col et arriver en cinq jours dans le liquide de culture, qu'il contamina.

2. Ce manomètre a été employé par Hankin, dans toutes les cultures anaérobies, comme soupape d'échappement pour les gaz.

sion négative. Il y avait un peu de trouble et une culture superficielle qui n'avait pas augmenté après six semaines d'étuve ; à ce moment, on a ouvert pour étudier la pureté et la virulence de la culture. On remplaça alors le tampon de coton, mais non la soupape, et on observa de suite une multiplication rapide dans ce flacon où l'air avait de nouveau accès. Il en a toujours été de même : pas de culture appréciable quand on empêchait l'accès de l'air, culture vigoureuse quand on le rendait.

Effets toxiques des cultures anaérobies. — Scholl ¹ dit avoir tiré des cultures anaérobies dans les peptones commerciales, deux peptones, dont l'une tuait en sept minutes les cobayes et autres rongeurs.

J'ai fait plusieurs fois la même expérience, par les moyens variés décrits plus haut, et dans divers milieux de culture : alcali-albumine, asparaginate de sodium, deux variétés de peptones commerciales, et toujours sans succès.

Après une incubation de vingt et un à quarante jours, ces cultures étaient incapables de produire la mort ; alors même qu'on les injectait à des doses de 7 à 12 c. c., elles semblaient tout à fait inoffensives.

Il a toujours été impossible non seulement d'obtenir des cultures virulentes, mais même des cultures vigoureuses, en l'absence complète de l'oxygène, ou même lorsqu'on laissait celui qui restait dans les liquides du flacon au moment du scellement ou de la fermeture.

Peut-être cet insuccès tient-il, comme nous l'avons dit plus haut, à ce que les vibrions de Scholl étaient plus vigoureux que les miens.

Pensant que peut-être la longue culture sur gélose du deuxième vaccin de Haffkine, avec passage intermittent chez les animaux, le rendait incapable de supporter la vie anaérobie, je me suis procuré, grâce à l'obligeance de M. le Dr Klein, deux cultures provenant des cas de choléra de Grimsby et de Yarmouth. Bien qu'elles fussent de date toute récente, je n'ai pas mieux réussi avec elles.

1. SCHOLL, *Archiv. für Hygiene*; XV, 1893, p. 172-215.

IV

TOXINES DE L'EXSUDAT PÉRITONÉAL DU COBAYE

A l'autopsie de chaque cobaye de contrôle, on a aspiré, au moyen d'une pipette stérile, le liquide péritonéal, et on l'introduisit de suite dans l'alcool absolu, où on l'a laissé séjourner, en agitant fréquemment pour assurer la précipitation complète.

Cinq semaines après la collecte du dernier liquide, on a filtré l'alcool et recueilli le précipité sur un disque filtrant, où on l'a lavé soigneusement avec de l'alcool de même force.

Ce précipité a été épuisé ensuite par l'eau distillée, après une agitation de quelques heures à la machine, et une nuit de repos dans un endroit frais : il restait assez d'alcool pour prévenir l'intervention des microbes. Finalement on a filtré et recueilli un liquide ambré.

L'extrait alcoolique a été évaporé à sec à 40° dans le vide et extrait de nouveau par l'alcool absolu. Un peu de matière a refusé de se dissoudre dans l'alcool et a été redissoute dans l'eau, puis ajoutée à l'extrait aqueux.

L'extrait alcoolique et l'extrait aqueux du précipité par l'alcool ont été concentrés dans le vide à 40° et étudiés.

a) *Extrait aqueux*. — Liquide jaunâtre, opalescent, pâle, ayant une faible réaction alcaline, bien qu'on ait ajouté quatre gouttes d'HCl à l'alcool employé pour l'extraction.

1° Il ne donnait pas de réaction du biuret ;

2° Il devenait un peu plus limpide à l'ébullition ;

3° Bouilli avec l'acide nitrique et additionné ensuite d'ammoniaque, couleur jaunâtre non orange (réaction xanthoprotéique) ;

4° Faible précipité rouge avec la liqueur de Millon.

b) *Extrait alcoolique*. — Solution alcoolique brune et limpide dont voici les réactions :

1° Insoluble dans l'eau froide et donnant un liquide trouble ;

2° Clarification par la chaleur ;

3° Odeur vive et piquante, s'attachant aux mains et aux liquides avec lesquels le liquide entrerait en contact ;

4° Pas de réaction xanthoprotéique.

J'avais peu de ces extraits, et la source n'en était pas abondante : je n'ai pu faire qu'un petit nombre d'expériences, mais

qui m'ont fourni des résultats curieux non seulement quant à la toxicité, mais encore quant au pouvoir immunisant du liquide.

Extrait aqueux. — On en a injecté 4 c. c. (2 c. c. dans chaque flanc) à un cobaye brun, et 1 c. c. dans le flanc droit d'un cobaye pie. L'injection a eu lieu à 3 heures 25. Voici les relevés de température avant et après l'injection :

Heures.	Cobaye brun.	Cobaye pie.
2,40	39,0	38,9
3,15	38,8	38,3
3,25	Inoc.	Inoc.
3,40	38,4	38,5
4,00	37,9	38,4
4,40	36,3	39,4
5,15	35,0	39,6
5,55	»	39,8
6,15	»	39,8
6,45	»	40,0
7,30	»	40,7
9,00	»	40,3

Pour le cobaye brun, on n'a pas suivi la marche de la température au-dessous de 35°, la graduation du thermomètre ne l'ayant pas permis. A 9 heures du soir, ce cobaye était mourant, on l'a trouvé mort le lendemain.

Le cobaye pie était au contraire vivant et bien portant le lendemain, et éprouvé six jours après; il a supporté sans trouble apparent une dose de vibrions vivants qui a tué en dix heures, avec les symptômes habituels, un animal deux fois plus gros que lui.

Extrait alcoolique, évaporé à siccité, et mis en suspension dans l'eau. Injection sous-cutanée, à 5 heures 35, à deux cobayes : l'un A en a reçu 3 c. c.; l'autre B, plus gros, 1 c. c. Voici le relevé des températures :

Heures.	Cobaye A.	Cobaye B.
2,40	39,2	38,7
3,15	39,1	38,9
5,15	39,2	39,1
5,35	Inoc.	Inoc.
5,55	38,1	38,3
6,15	37,8	38,2
6,45	36,8	38,3
7,30	35,4	39,2
9,00	36,0	40,8
9,45	36,8	»

Le cobaye A, éprouvé six jours après pour son immunité, a succombé trois heures et demie après le témoin qui était deux

fois plus gros. Beaucoup de fluide péritonéal rempli de cellules, peu de bacilles. Le cobaye témoin avait des masses de bacilles et peu de cellules.

Le cobaye B a survécu à l'inoculation d'épreuve, faite six jours après ; mais il était deux fois plus gros que les autres animaux. Il était pourtant de même taille que le témoin qui a succombé.

Il est impossible de tirer des conclusions précises de ce petit nombre d'expériences.

L'extrait alcoolique ne semble pas aussi toxique que l'extrait aqueux, et son inoculation n'a pas donné un haut degré d'immunité. L'extrait aqueux était à la fois toxique et immunisant. Dans une autre expérience avec un extrait aqueux retiré aussi d'une exsudation péritonéale d'animaux témoins, le pouvoir immunisant a été aussi clairement établi.

On n'a pu obtenir des quantités suffisantes de cet exsudat, les seuls animaux qui le fournissaient étant des animaux de contrôle.

V

POISONS CHIMIQUES DE LA CULTURE DANS UN MILIEU NON ALBUMINOÏDE

Les résultats de Buchner et Uschinsky (*l. c.*) sur la culture dans un milieu non albuminoïde, m'ont suggéré un moyen de jeter une lumière nouvelle sur la nature de la toxine ou des toxines du comma bacille : ce milieu a été préparé avec les quelques modifications mentionnées :

Chlorure de sodium	5 à 7
Chlorure de calcium	0,1
Sulfate de magnésium	0,2
Phosphate de sodium ¹	2,5
Lactate d'ammonium	6 à 7
Asparaginate de sodium	3,4
Eau ²	1000,0

1. Substitué au phosphate de potassium, à cause de l'action dépressive et toxique des sels de potasse sur les rongeurs.

2. On n'a pas mis de glycérine, parce que la culture était aussi abondante en son absence, et parce qu'elle rendait difficile l'évaporation à siccité.

Le liquide obtenu était limpide, incolore, et neutre au tournesol. Après stérilisation à l'autoclave, il a été ensemencé avec du bacille du choléra. Après quatre jours, comme il n'y avait pas de culture visible, on a ajouté une petite quantité de solution stérilisée d'hydrate de sodium, de sorte que le liquide en contenait 0,5 0/0.

Cette addition a toutefois précipité des flocons amorphes et de fines aiguilles formées de phosphate de chaux et de phosphate ammoniaco-magnésien, qui sont tombés au fond du vase.

Après réensemencement, on a eu une culture vigoureuse, typique, donnant un trouble général avec de l'écume à la surface.

On a laissé à l'étuve trois au quatre semaines, au bout desquelles le liquide était presque partout devenu légèrement jaunâtre et opaque. La plus grande partie de l'écume et des précipités, dus à la multiplication des bacilles, formaient, avec les phosphates gélatineux, une masse visqueuse au fond des flacons, surtout de ceux qui avaient été agités par intervalles. Il n'y a pas eu d'indol formé, ni d'odeur apparente pendant la culture.

Après vingt à trente jours, on a filtré sur la porcelaine stérilisée, et obtenu un liquide limpide, légèrement jaunâtre ou ambré. La filtration a été beaucoup plus difficile qu'avec les milieux albuminoïdes.

Le liquide filtré de 250 c. c. de culture a été évaporé à siccité dans le vide à 40°, et agité pendant trois heures, dans une machine, avec 250 c. c. d'alcool absolu, puis abandonné pendant quarante-huit heures, en l'agitant violemment de temps en temps. Le précipité a été réuni sur un filtre, et soigneusement lavé à l'alcool, puis dissous dans 50 c. c. d'eau distillée, dialysé soixante-douze heures à la façon ordinaire, en présence de 1,250 c. c. d'eau distillée qu'on a changée deux fois. Finalement on a évaporé à sec à 40°, et dissous dans 10 c. c. d'eau distillée. Le produit final était une substance transparente, brune, non cristalline, soluble dans l'eau, et fournissant les réactions suivantes :

- 1° Légèrement alcaline au tournesol;
- 2° Pas de précipité à la neutralisation ;
- 3° Pas de réaction du biuret;
- 4° Légère réaction xanthoprotéique.

Action sur les cobayes. — Sur trois cobayes qui en ont reçu chacun 1 c. c. sous la peau, deux sont morts en neuf et onze heures : le troisième s'est rétabli.

Chez ce dernier, la température a baissé graduellement pendant cinq heures jusqu'au-dessous de 35°, et est redevenue ensuite normale; chez les autres, elle a baissé jusqu'à la mort.

Cette toxine, à faible dose, a produit l'immunité contre des doses mortelles de cultures vivantes.

La viscosité extrême du précipité dans les cultures avec asparagine, et la difficulté de filtration font croire qu'une grande partie de la toxine n'a pas du tout traversé le filtre. Pour éviter cette difficulté, on a commencé par laver le précipité avec une solution de soude caustique à 5 0/0 qui dissolvait une proportion notable des corps des microbes.

Une solution étendue (3 0/0) d'acide chlorhydrique, poussée alors à travers le filtre, a dissous les phosphates, et aussi, comme on l'a vu plus tard, un peu de la matière du filtre.

Le mélange des deux liquides très limpides a donné un fort précipité gélatineux qu'on a laissé déposer et lavé sur filtre pendant trente-six heures, jusqu'à disparition de toute réaction xanthoprotéique dans le liquide et dans le précipité, qui était une masse gélatineuse consistant en phosphates insolubles et sels d'alumine du filtre. Des doses de 5 c. c. d'une émulsion de ce précipité gélatineux ont tué un cobaye, en douze et vingt-quatre heures. Les mêmes doses, chauffées à 120° à l'autoclave, n'étaient plus mortelles, tout en donnant un collapsus dont l'animal se rétablissait en peu d'heures.

Les deux lots d'animaux inoculés ont présenté les mêmes symptômes de collapsus rapide : dyspnée, crampes et chute immédiate de température. Chez ceux qui ont reçu le virus chauffé, la température a regagné ou dépassé la normale après quelques heures, pendant qu'elle restait au-dessous de la normale chez les autres, avec chute graduelle jusqu'à la mort.

Il y avait donc là un précipité de substances chimiques ayant entraîné un ou plusieurs corps inconnus capables d'amener la mort. Bien que le précipité eût été lavé jusqu'à disparition de toute trace de matière albuminoïde, décelable par la réaction xanthoprotéique ou d'autres réactions, en brûlant la matière

elle se charbonnait et montrait contenir de la matière organique¹.

CONCLUSIONS

Les recherches qui précèdent montrent que les substances, retirées de cultures du vibrion cholérique dans divers milieux, n'ont pas la même constitution chimique, autant que nous pouvons en juger par les méthodes usuelles, et qu'il y a pourtant une certaine uniformité dans leurs effets physiologiques. Ainsi :

1^o De cultures sur l'alcali-albumine, on retire :

- a) Une deutéro-albumose;
- b) Des traces de proto-albumose;
- c) Des quantités variables d'une matière protéique (probablement de l'alcali-albumine).

2^o De cultures sur l'œuf :

- a) Un mélange de matières protéiques impossibles à séparer.

3^o De l'exsudat péritonéal :

- a) Une substance qui, tout en donnant une légère réaction xanthoprotéique, ne contenait en apparence ni deutéro-albumose ni proto-albumose.

4^o Des cultures sur l'asparaginate de sodium :

- a) Une substance qui donnait une faible réaction xanthoprotéique, mais pas celle du biuret.

Ces substances semblent différentes dans leur nature chimique et se ressemblent dans leur action physiologique.

Elles produisent toutes des effets mortels, ou, à petites doses, elles donnent une immunité marquée vis-à-vis des cultures vivantes.

1. J'ai purifié de la peptone de Grubler, par saturation avec le sulfate d'ammoniaque, que j'ai éliminé ensuite avec l'hydrate et le carbonate de baryte, par la méthode de Kühne et Chittenden. Je m'en suis servi comme milieu de culture en solution faiblement alcaline, et après addition d'un peu de sel marin. En filtrant et évaporant, on obtient un liquide brun limpide, qui, saturé par le sulfate d'ammoniaque, a donné à nouveau un précipité qu'il ne donnait pas avant culture. Ce précipité purifié produisait des effets toxiques sur les cobayes, auxquels on l'inoculait en solution faiblement alcaline.

Il est très difficile d'obtenir en grande quantité cette peptone purifiée; c'est pour cela qu'on en a abandonné l'usage pour employer la solution d'asparagine.

J'ai vu aussi qu'on avait de bons développements avec de vieux bouillons de culture inoculés plus de onze mois auparavant. Ces cultures, fermées au coton, étaient restées à la température ordinaire.

Ainsi nous avons trouvé des matières qui, autant que nous pouvons l'affirmer avec nos méthodes imparfaites, appartiennent aux peptones sans albumoses, et donnent les mêmes effets physiologiques que les toxines isolées de l'exsudat péritonéal des cobayes morts après inoculation du choléra, toxines qui pourtant ne contiennent aucune quantité appréciable de peptone ou d'albumose.

Dans le cas des cultures sur alcali-albumine, l'immunité obtenue par le précipité produit par la neutralisation (quoique privé de peptone et d'albumine), était aussi marquée que celle que donnaient les proto et deutéro-albumoses (privées d'alcali-albumine).

Les seules conclusions sont donc que : ou bien le vibron du choléra donne différents produits chimiques quand on le cultive dans différents milieux, ce qui, *a priori*, est extrêmement improbable; ou bien sa toxine est une substance constante et uniforme associée avec les matériaux protéiques contenus dans le milieu de culture, ou formés pendant la culture. Il semble probable que, dans un milieu de culture privé de substances protéiques, la toxine est plus pure. Au moins, est-il très remarquable que dans ce milieu la toxine est presque débarrassée de toute substance protéique appréciable, et ne donne aucune des réactions qui permettraient de la classer dans les albumoses, peptones, globulines ou alcaloïdes.

Ces recherches tendent donc à confirmer l'opinion de Duclaux ¹, à laquelle nous avons fait allusion plus haut, et suivant laquelle les substances, si souvent décrites comme toxalbumines, sont des mélanges d'albumines et de toxines, plutôt que de vrais composés chimiques.

1. DUCLAUX, *Annales de l'Institut Pasteur*, p. 380, 1890.

LA RAGE EXPÉRIMENTALE CHEZ LE CHAT

PAR MM. LES DOCTEURS

L. DE BLASI ET G. RUSSO TRAVALI

(Institut antirabique municipal de Palerme.)

On sait tout ce que les expériences modernes ont ajouté aux notions cliniques et pathologiques que nous avons sur la rage, et c'est à elles qu'il faut s'adresser pour éclaircir ce qui reste de points obscurs. Divers observateurs, parmi lesquels Magendie, Bader, Cappello, Rossi, Breschet, ont émis l'opinion, basée sur des observations cliniques, que le virus rabique, dans ses passages successifs par morsure de chien à chien, modifie sa virulence de façon à ne pouvoir plus être transmis à l'homme par morsure, après deux ou trois passages sur le chien.

L'inoculation endocranienne, par la sûreté qu'elle donne à la transmission de la rage, a permis de transporter la question du domaine de la clinique dans celui de l'expérimentation, et Celli et Marino-Zuco ont tiré de leurs recherches la conclusion que « dans ces passages successifs de chien à chien, le virus rabique, soit des rues, soit de l'homme, se modifie en ce sens qu'après six à dix passages au maximum, la forme furieuse se perd, et on n'observe d'ordinaire que la forme paralytique ou consomptive... Si pourtant on tient compte de la durée de la période d'incubation, on pourrait dire qu'en définitive et en général, après un certain nombre de passages et aussi de variations d'intensité, ce virus va en s'atténuant, si bien qu'alors il est rarement transmissible au lapin ¹. »

Que le virus des rues n'ait pas toujours la même intensité, c'est ce que démontre la durée variable d'incubation de la rage qu'on observe souvent chez le lapin qu'il a servi à inoculer. Cette durée est d'ordinaire de 15 à 20 jours, mais il n'est pas rare qu'elle soit plus longue ou plus courte. Sur 374 inoculations

1. *Annali dell'Istituto d'Igiene sper. di Roma*, t. II, p. 63, 1892.

d'épreuve, faites depuis les sept ans de fonctionnement de l'Institut de Palerme, nous avons vu un cas où les premiers symptômes de paralysie ont éclaté au bout de 3 jours chez le lapin inoculé, qui est mort le 7^e jour, et un passage nouveau sur un second lapin, qui fut pris de la rage le 14^e jour, montra que la diagnose du premier cas avait été exacte ¹.

Dans 3 cas, la paralysie survint le 7^e jour; dans 3 autres en 9; dans 2 après 10, et dans 5 après 11 jours. Nombreux sont les cas où l'échéance a été de 12 à 13 jours. Mais nous en avons un où elle a été de 28 jours, un autre de 39, un autre de 46 et un dernier de 47 jours.

Sur 18 inoculations faites avec la substance nerveuse de chats, la période d'incubation s'est maintenue ce qu'elle était avec le chien; une seule fois on a eu la rage après 11 jours.

Sachant donc que le virus rabique n'a pas toujours chez le chien la même intensité, et qu'il s'atténue dans les passages successifs de chien à chien, il faut admettre qu'il existe dans la nature des conditions qui le renforcent quand il est atténué, de façon à permettre la perpétuité de cette maladie très ancienne.

Ces conditions peuvent exister soit en dehors de l'organisme animal, soit dans cet organisme lui-même.

On sait que le virus rabique résiste peu aux agents physiques, et nous avons montré ² qu'il se laisse facilement affaiblir et détruire. On peut donc concevoir l'existence, en dehors de l'organisme, de ces conditions qui affaiblissent, maintiennent ou renforcent la virulence. Nous avons aussi voulu voir si un affaiblissement de l'organisme animal ne contribuerait pas à augmenter la virulence du virus rabique, comme il le fait pour presque toutes les maladies infectieuses. Cet affaiblissement, nous avons cherché à l'obtenir par un jeûne complet; mais nous avons vu quatre vigoureux lapins mourir ainsi en 4 ou 5 jours, avant l'apparition de tout symptôme de rage. Nous avons dû nous contenter de soumettre l'animal à une alimentation insuffisante.

1. Rappelons que nos lapins pèsent en moyenne de 1,000 à 1,300 grammes et que notre longue pratique des inoculations nous permet d'affirmer que la concentration et la quantité de liquide inoculé sont presque toujours les mêmes. On sait, en effet, que la période d'incubation de la maladie peut varier suivant le poids de l'animal et la quantité de virus inoculé.

2. *Riforma medica*, 1889, p. 602.

Huit lapins de 1,200 à 1,300 gr. ont été soumis pendant cinq jours à la ration journalière de 80 grammes de verdure, et le 4^e jour, au moment où ils avaient perdu 100 à 150 grammes de leur poids, ils ont reçu par trépanation du virus de passage. Puis on a continué la diète. La paralysie est survenue chez tous le 6^e jour et la mort le 7^e jour, au moment où ils avaient perdu environ 300 grammes de leur poids.

Comme on voit, l'effet de la diète a été nul sur la période d'incubation du virus fixe. Il était intéressant de savoir s'il en était de même pour la rage des rues. Comme la ration précédente ne laisse pas vivre le lapin plus de 10 à 11 jours, il a fallu l'augmenter un peu pour ces nouvelles expériences. Quatre lapins, qui recevaient par jour 40 grammes de son et 60 grammes de verdure, ont reçu par trépanation, après quatre jours de ce régime, du virus des rues, et deux autres, inoculés comme animaux de contrôle, ont continué à recevoir en moyenne 75 grammes de son et 180 grammes de verdure. Un des quatre premiers lapins est mort par accident; chez les trois autres, la paralysie est survenue en 16 à 18 jours, comme chez les lapins de contrôle.

L'affaiblissement de l'organisme par alimentation insuffisante semble donc incapable de renforcer le virus fixe ou le virus des rues¹.

Nous avons cherché dans une autre direction. On sait, par les expériences de M. Pasteur, que le virus rabique s'atténue par passage au travers du singe, et se renforce au travers des cobayes et des lapins. Ces deux dernières espèces ne jouant

1. Nous avons voulu répéter ces expériences sur des pigeons. On sait que ces animaux sont peu aptes à prendre la rage (*Gibier*, C. R. Acad. de sc., 1884) et guérissent spontanément après avoir présenté des symptômes différents de ceux des autres animaux. Il était donc utile de rechercher si l'affaiblissement organique préparait chez eux un terrain plus propre au développement du virus, et avait une influence sur la marche de la rage.

Quatre pigeons (300, 380, 435 et 500 grammes) furent soumis pendant huit jours à une alimentation réduite de 20 grammes de froment pour chacun par jour. Ils avaient alors perdu environ 100 grammes de leur poids, et ils furent alors inoculés avec de la substance cérébrale; les deux premiers avec du virus fixe, les deux autres avec du virus des rues provenant de la moelle d'un chien mort de rage furieuse et ayant subi un premier passage par le lapin. Après deux mois de la même alimentation, les pigeons pesaient 496, 250, 290 et 330 grammes. Ils n'avaient présenté aucun symptôme de rage.

Une autre expérience fut faite de même sur quatre autres pigeons, sans qu'on ait rien vu qui pût faire soupçonner une maladie rabique. De ces pigeons un est mort un mois, l'autre 36 jours après l'inoculation. Les deux autres furent tués après deux mois; les quatre cerveaux mis en émulsion et inoculés à des cobayes n'ont produit aucun effet.

d'ordinaire aucun rôle dans la transmission de la rage à l'homme ou au chien, on ne peut pas les faire intervenir dans l'explication du renforcement naturel du virus rabique. Mais il restait à voir si le même renforcement ne s'observerait pas aussi chez un animal domestique capable de transmettre la rage à l'homme et au chien. Nous avons pensé au chat. La statistique déjà assez ancienne de l'Institut Pasteur montre que sur 11,729 animaux mordeurs, le chat figure 736 fois et le chien 10,922 fois. C'est une proportion de 1 à 15. Le chat est donc un agent assez fréquent de transmission.

Nous nous sommes posé à ce sujet diverses questions.

I

QUELLE EST LA DURÉE D'INCUBATION CHEZ LE CHAT ET CHEZ LE CHIEN INOCULÉS AVEC LE VIRUS DE LA RAGE DES RUES ?

Le 5/3/93 : inoculation intracrânienne d'un chat et d'un lapin avec la moelle d'un chien suspect de rage. — 16/3 : le chat est très agité, miaule continuellement d'une voix rauque, et tente de se jeter sur qui l'approche. On fait l'examen des urines qui sont rares; pas d'albumine ni de sucre. La même recherche, plusieurs fois répétée dans d'autres expériences, soit avec le virus fixe, soit avec le virus des rues, a toujours été négative. — 19/3 : commencement de paralysie chez le chat. — 22/3 : symptômes de paralysie chez le lapin.

Le 20/3/93 : même expérience avec le virus d'un chien tué en pleine rage furieuse. — 26/3 : le chat est paralysé, miaule d'une voix rauque, est abattu, mais regimbe quand on le touche avec une baguette. — 9/4 : paralysie chez le lapin.

Le 24/3/93 : même expérience avec la moelle d'un chien qui avait mordu diverses personnes. — 4/4 : paralysie chez le chat avec les symptômes ordinaires. — 10/4 : paralysie chez le lapin.

Le 26/3/93 : même expérience avec la moelle d'un chien suspect de rage. — 9/4 : paralysie du chat et du lapin.

Le 29/3/93 : même expérience avec la moelle d'un chien mort de rage furieuse. 10/4 : paralysie chez le lapin. — 12/4 : le chat est paralysé, refuse la nourriture, tente de mordre; miaulement avec la voix ordinaire.

Le 2/4/93 : même expérience avec la moelle d'un chien rabique. — 16/4 : paralysie chez le chat et chez le lapin.

Le 7/4/93 : même expérience. — 14/4 : paralysie chez le chat. — 22/4 : paralysie chez le lapin.

De ces expériences résulte que la paralysie est survenue :

en 12, 6, 11, 14, 14, 14, 7 jours chez le chat

en 17, 14, 17, 14, 12, 14, 15 jours chez le lapin.

Le virus de la rage des rues a donc évolué, 4 fois sur 7, plus vite chez le chat que chez le lapin, avec une différence de 5, 8, 6 et 8 jours ¹. Ce fait peut avoir quelque intérêt pour les Instituts de vaccination antirabique, lorsqu'il s'agit de savoir si un animal mordeur était ou non enragé. Le chat donne ce renseignement plus vite que le lapin.

II

COMMENT SE COMPORTE LE VIRUS DES RUES DANS LES PASSAGES SUCCESSIFS
DE CHAT A CHAT ?

Le 24/4/93, avec un virus de rue provenant d'un premier passage sur le lapin (paralysie le 16^e jour), on inocule un chat roux pesant 1,300 grammes. Le 29/4, le chat est très agité et tente de se jeter sur qui l'approche. Le 30/4, on note les premiers symptômes de paralysie. Miaulement rauque caractéristique. Le 2/5, paralysie complète. Mort le 3/5. Poids 1,200 grammes. — On commence les passages en inoculant à chaque fois, sous la dure-mère, avec la moelle du chat mort, un nouveau chat et un lapin de contrôle. Nos résultats sont résumés dans le tableau suivant, qui, pour chaque passage, donne l'époque d'apparition de la paralysie (P.), le moment de la mort (M.). Les poids des animaux au moment de la trépanation et à celui de la mort sont inscrits entre parenthèses. Nous avons dit quel était le poids moyen de nos lapins ; la perte moyenne après inoculation est de 100 à 150 grammes, et ceci est dit une fois pour toutes.

Numéro du Dates, passage.		Chat.		Lapin.	
3/5/93	1 ^{er}	Tigré (2,120 gr.).	P. le 11 (1,650 gr.).	P. le 9.	M. le 10.
14/5	2 ^e	Roux (2,730 gr.).	P. le 17. M. le 20 (2,220 gr.).	P. le 17.	M. le 19.
20/5	3 ^e	Noir (1,920 gr.).	P. le 25. M. le 27 (1,500 gr.).	P. le 26.	M. le 27.
27/5	4 ^e	Noir (2,200 gr.).	P. le 2/6. M. le 3 (1,750 gr.).	P. le 2/6.	M. le 6.
3/6	5 ^e	Blanc (2,090 gr.).	P. le 10. M. le 12 (1,800 gr.).	P. le 10.	M. le 11.
12/6	6 ^e	Tigré (1,520 gr.).	P. le 17. M. le 20 (1,250 gr.).	P. le 17.	M. le 19.
20/6	7 ^e	Noir (1,890 gr.).	P. le 26. M. le 29 (1,415 gr.).	P. le 26.	M. le 29.
29/6	8 ^e	Blanc (2,250 gr.).	P. le 5/7. M. le 8 (2,150 gr.).	P. le 5/7.	M. le 6.
8/7	9 ^e	Blanc (1,000 gr.).	P. le 14. M. le 17 (810 gr.).	P. le 14.	M. le 16.
17/7	10 ^e	Roux (1,730 gr.).	P. le 23. M. le 25 (1,570 gr.).	P. le 23.	M. le 25.
25/7	11 ^e	Noir (2,350 gr.).	P. le 30. M. le 1 8 (1,870 gr.).	P. le 30.	M. le 1 8.
1/8/93	12 ^e	Noir (1,400 gr.).	P. le 6. M. le 8 (1,280 gr.).	P. le 6.	M. le 8.
		Roux (1,670 gr.).	P. le 7. Tué le 8 (1,410 gr.).		
8/8	13 ^e	Tigré (1,980 gr.).	P. le 14. M. le 17 (1,500 gr.).	P. le 14.	M. le 16.
		Blanc (1,770 gr.).	P. le 14. Tué le 15 (1,530 gr.).		
15/8	14 ^e	Bl. etn. (1,670 gr.).	P. le 21. M. le 24 (1,570 gr.).	P. le 21.	M. le 22.
		Noir (2,270 gr.).	P. le 21. Tué le 22 (1,900 gr.).		

1. On a observé la même avance de 4 à 5 jours dans deux cas d'inoculations multiples faites comparativement à un lapin et à un chat. Les inoculations avaient été faites sous la dure-mère et en outre aux membres postérieurs, pour éviter les morsures du chat, animal incommode à manier. C'est là peut-être la raison pour laquelle nous n'avons observé aucune diminution dans la durée d'incubation. Nous avons vu que la rapidité de propagation du virus augmente à mesure que diminue la distance de la lésion aux centres nerveux. (*Riforma medica*, avril 1889.)

Numéro du Date. passage.		Chat.		Lapin.
22/8	15°	Roux (1,900 gr.). P. le	27. Tué le 29 (1,510 gr.).	P. le 27. M. le 29.
		Noir (1,830 gr.). P. le	27. Tué le 29 (1,730 gr.).	
29/8	16°	Noir (1,660 gr.). P. le	3/9. M. le 4 (1,100 gr.).	P. le 3/9. M. le 5.
		Tigré (1,820 gr.). P. le	3/9. Tué le 4 (1,610 gr.).	
4/9	17°	Roux (2,420 gr.). P. le	40. Tué le 41 (2,150 gr.).	P. le 40. M. le 41.
		Bl. etr. (3,550 gr.). P. le	40. Tué le 41 (2,800 gr.).	
11/9	18°	N. etr. (1,750 gr.). P. le	17. Tué le 18 (1,450 gr.).	P. le 17. M. le 19.
		Noir (2,920 gr.). P. le	17. Tué le 18 (2,310 gr.).	
18/9	19°	Tigré (1,560 gr.). P. le	23. Tué le 23 (1,760 gr.).	P. le 23. M. le 24.
		Blanc (2,180 gr.). P. le	24. Tué le 25 (1,430 gr.).	
25/9	20°	Bl. etn. (2,220 gr.). P. le	30. Tué le 2 (1,840 gr.).	P. le 30. M. le 2/10.
		Noir (2,630 gr.). P. le	30. Tué le 2 (2,300 gr.).	
2/10	21°	Blanc (1,900 gr.). P. le	7. Tué le 7 (1,615 gr.).	P. le 7. M. le 9.
		Roux (1,700 gr.). P. le	7. Tué le 7 (1,430 gr.).	
7/10	22°	Noir (1,350 gr.). P. le	14. Tué le 14 (1,110 gr.).	P. le 14. M. le 15.
		Roux (1,650 gr.). P. le	14. Tué le 14 (1,435 gr.).	
14/10	23°	Tigré (2,500 gr.). P. le	20. Tué le 20 (2,100 gr.).	P. le 20. M. le 21.
		Bl. etn. (1,550 gr.). P. le	20. Tué le 20 (1,160 gr.).	
20/10	24°	Roux (1,660 gr.). P. le	25. Tué le 28 (1,400 gr.).	P. le 26. M. le 28.
		Noir (2,800 gr.). P. le	26. Tué le 28 (2,300 gr.).	
28/10	25°	Tigré (1,800 gr.). P. le	2/11. Tué le 3 (1,620 gr.).	P. le 2/11. M. le 3.
		Blanc (3,000 gr.). P. le	2/11. Tué le 3 (2,430 gr.).	
3/11	26°	Roux (1,720 gr.). P. le	8. Tué le 9 (1,500 gr.).	P. le 8. M. le 10.
		Cendré (2,320 gr.). P. le	8. Tué le 9 (1,950 gr.).	
9/11	27°	Noir (2,420 gr.). P. le	15. M. le 18 (2,100 gr.).	P. le 14. M. le 16.
		Tigré (1,350 gr.). P. le	14. Tué le 14 (1,120 gr.).	
14/11	28°	Blanc (1,750 gr.). P. le	20. Tué le 20 (1,460 gr.).	P. le 20. M. le 22.
		Roux (2,500 gr.). P. le	20. Tué le 20 (2,430 gr.).	
20/11	29°	Roux (1,800 gr.). P. le	26. Tué le 26 (1,450 gr.).	
		Cendré (1,963 gr.). P. le	26. Tué le 26 (1,720 gr.).	P. le 26. M. le 28.
26/11	30°	Blanc (1,840 gr.). P. le	1/12. Tué le 2 (1,500 gr.).	P. le 1. M. le 3.
		Roux (2,430 gr.). P. le	1/12. Tué le 2 (2,115 gr.).	
2/12	31°	Noir (1,823 gr.). P. le	8. Tué le 8 (1,610 gr.).	P. le 8. M. le 9.
		Blanc (2,350 gr.). P. le	8. Tué le 8 (1,945 gr.).	
8/12	32°	Cendré (1,640 gr.). P. le	14. Tué le 14 (1,250 gr.).	P. le 14. M. le 15.
		Blanc (1,720 gr.). P. le	14. Tué le 14 (1,436 gr.).	
14/12	33°	Roux (1,800 gr.). P. le	49. M. le 20 (1,465 gr.).	P. le 19. M. le 21.
		R. etn. (2,360 gr.). P. le	49. M. le 21 (2,100 gr.).	

A partir du 12^e passage, pour éviter que la mort accidentelle d'un des chats ne vienne interrompre la série des inoculations, nous inoculons à chaque fois deux chats. Le passage a toujours été fait avec celui qui est marqué second au tableau.

En outre, avec le virus du 32^e passage, on a inoculé un chien de moyenne grandeur qui, trépané le 8, a été pris de paralysie le 14 et est mort le 18. — Avec le virus du 33^e passage, on a inoculé un chien qui a été pris de paralysie le 20 et est mort le 23.

Comme on le voit par toutes ces expériences, le virus des rues, par passages de chat à chat, atteint bientôt une période d'incubation de cinq à six jours, qu'il conserve après 33 passages, sans aucun symptôme d'atténuation.

Il est toujours transmissible au lapin, et aussi au chien, après

32 ou 33 passages, en conservant chez ces animaux la même virulence, c'est-à-dire en déterminant la rage après une période d'incubation de six jours, comme chez le chat.

III

COMMENT SE COMPORTE LE VIRUS FIXE DANS SES PASSAGES DE CHAT A CHAT ?

Le 11/3/93, avec la moelle de la série du jour, on inocule un chat roux pesant 3,300 grammes. — Le 16/3. Paralyse avec les symptômes ordinaires, miaulement rauque, refus de nourriture et de boisson, abattement et phénomènes d'excitation quand on s'approche. — Mort le 18/3. Poids : 2,790 grammes. On commence une série de passages, résumés dans le tableau suivant :

Date.	Numéro du passage.	Chat.	Lapin.
18/3	1 ^{er} Blanc (2,850 gr.).	P. le 24. M. le 27 (2,500 gr.).	P. le 24. M. le 26.
27/3	2 ^e Noir (2,870 gr.).	P. le 4/4. M. le 6 (2,580 gr.).	P. le 4/4. M. le 6.
6/4	3 ^e Cendré (2,180 gr.).	P. le 12. M. le 13 (1,840 gr.).	P. le 12. M. le 13.
13/4	4 ^e Blanc (2,020 gr.).	P. le 19. M. le 21 (1,530 gr.).	P. le 19. M. le 20.
21/4	5 ^e Noir (1,880 gr.).	P. le 28. M. le 1/5 (1,475 gr.).	P. le 28. M. le 30.
1/5	6 ^e R. et bl. (1,920 gr.).	P. le 7. M. le 8 (1,870 gr.).	P. le 7. M. le 9.
8/5	7 ^e Roux (1,270 gr.).	P. le 13. M. le 16 (1,000 gr.).	P. le 13. M. le 15.
16/5	8 ^e Noir (1,850 gr.).	P. le 22. M. le 25 (1,400 gr.).	P. le 22. M. le 24.
25/5	9 ^e Blanc (1,740 gr.).	P. le 2/6. M. le 5 (1,500 gr.).	P. le 2/6. M. le 4.
5/6	10 ^e Blanc (1,480 gr.).	P. le 11. M. le 13 (1,220 gr.).	P. le 11. M. le 12.
13/6	11 ^e Tigré (1,400 gr.).	P. le 19. M. le 22 (945 gr.).	P. le 19. M. le 22.

La mort accidentelle du chat et du lapin inoculés au 12^e passage a empêché de continuer les expériences, mais les résultats des essais précédents, et le fait que le virus a conservé aussi dans cette série sa période d'incubation, nous permettent de dire que le virus fixe ne subit aucune atténuation dans ses passages successifs de chat à chat.

IV

COMMENT SE COMPORTE, SUR LE CHAT, LE VIRUS FIXE ATTÉNUÉ, PAR COMPARAISON AVEC LE LAPIN ?

Dans ces expériences nous nous sommes servis de moelles de lapin conservées 5, 4 et 3 jours.

Le 16/12, avec une moelle du 11, on inocule par trépanation un chat blanc qui est paralysé le 31, tué le 2 janvier 1894, et sert à inoculer un chat noir, qui est paralysé le 8. — Le même jour, 16/12, avec la même moelle de 5 jours, on inocule un lapin, qui résiste. Ceci confirme le fait signalé en 1888¹, que la moelle de 5 jours des lapins de Palerme ne donne pas la rage au lapin.

Le 18/12, avec une moelle du 14, on inocule un chat qui montre des symptômes

1. *Relazione del 1^o anno di vita della Staz. antirabbica di Palermo (Celli e de Blasi) Palerme, 1888.*

de paralysie le 29. Le 1^{er} janvier, on fait un passage à un autre chat, qui montre de la paralysie le 12. Sa moelle, inoculée le 15 à un troisième chat, lui donne la paralysie le 21. — Le 18/12, avec la même moelle qui a servi au premier chat, on inocule un lapin, qui est paralysé le 24/1 1894. On fait ce jour-là un passage à un second lapin, qui est paralysé le 30.

Le 18/12, avec une moelle de 3 jours, on inocule un chat qui est paralysé le 25. La moelle est inoculée le 26 à un autre chat, paralysé le 31. — La même moelle de 3 jours sert à inoculer un lapin, qui est paralysé le 25. A un nouveau passage, la paralysie survient en 6 jours.

On voit par là que le virus atténué se renforce chez le chat à la première inoculation, tandis que chez le lapin c'est seulement au 2^e passage.

La moelle de cinq jours a donné en quinze jours la rage au chat sans la donner au lapin. Celle de quatre jours a donné, en onze jours, la rage au chat, et seulement en trente-sept jours au lapin. La période d'incubation avec la moelle de trois jours a été de sept jours tant chez le chat que chez le lapin.

De ces expériences, nous croyons pouvoir tirer les conclusions suivantes :

Le virus rabique trouve, chez le chat, un terrain plus favorable que chez le lapin. Sa période d'incubation est presque toujours plus courte, et, quand il est atténué, il recouvre plus facilement sa virulence.

Le virus de la rage des rues, en passant de chat à chat, conserve sa virulence et acquiert très vite une période quasi fixe d'incubation, qu'on peut considérer comme plus courte que chez le lapin, si on tient compte de la différence de grandeur des animaux.

Le virus fixe ne subit aucune atténuation par passage sur le chat.

Si on tient compte, maintenant, de ce que le chat est, après le chien, l'animal domestique qui transmet, le plus souvent, la rage à l'homme, et que le virus rabique subit chez lui un renforcement, il n'est pas trop hardi de conclure, des expériences qui précèdent, que le chat est, peut-être, un des agents qui contribuent le plus à perpétuer la rage.

FONDATION D'UNE STATION ANTIRABIQUE A TUNIS

PAR M. LE D^r A. LOIR.

Le gouvernement tunisien vient de décider la création d'une station antirabique annexée au Laboratoire de bactériologie de la Régence de Tunis. L'utilité de cette création ressort d'une façon indiscutable des chiffres que voici. Le nombre des personnes mordues en Tunisie, et qui sont allées à Paris pour se faire traiter, a été de :

Du 17 juin 1886 au 31 décembre 1887.....	13
En 1888.....	9
— 1889.....	5
— 1890.....	23
— 1891.....	21
— 1892.....	32
— 1893.....	37
Soit en tout.....	140 personnes.

De plus, la colonie italienne de la Régence envoie à l'Institut Pasteur de Palerme ses nationaux mordus par des chiens enragés. Les personnes qui vont ainsi en Sicile sont à peu près en nombre égal à celles qui vont à Paris.

Enfin, les Arabes n'acceptent qu'un très petit nombre de quitter la Tunisie pour se faire traiter. J'ai fait il y a trois mois l'autopsie d'un chien, mort avec des symptômes suspects, après avoir mordu trois femmes arabes, un chien et un chat. J'ai trouvé dans son estomac du bois, de la terre, des corps étrangers, et j'ai posé le diagnostic de rage, confirmé depuis par la mort en 23 jours d'un lapin inoculé dans la chambre antérieure de l'œil. Le chien et le chat mordus ont été abattus, mais il a été impossible de décider les trois femmes à quitter la Tunisie.

C'est ce qui arrive presque toujours, et il est intéressant de se demander ce que deviennent ainsi les Arabes abandonnés à eux-mêmes. Je dois à M. Roy, secrétaire général du gouvernement tunisien, une statistique du nombre des indigènes tunisiens, mordus par des chiens atteints ou suspects de rage, et qui ont refusé de se rendre à l'Institut Pasteur. Il y en a eu huit en 1891, quatre en 1892, onze en 1893, soit en tout vingt-trois. Sur ce nombre, le ministère a reçu avis de deux décès causés par la rage en 1892, de quatre en 1893, soit six en tout, tandis qu'il n'y en a eu aucun sur les cent quarante personnes du tableau ci-dessus, traitées à l'Institut Pasteur.

Les chiffres de cette petite statistique sont naturellement inférieurs à la réalité, car, d'une part, le gouvernement n'est averti, et n'insiste pour faire partir les mordus, que lorsque les morsures sont graves et que l'histoire du chien a fait événement dans le pays; de l'autre, il y a des morts rabiques qu'il ignore. La rage est très répandue en Tunisie, mais il est difficile de dire dans quelle mesure elle sévit, car son diagnostic n'est pas toujours facile à poser, lorsqu'on n'a pas, à portée, un laboratoire outillé pour des inoculations.

Voici un fait qui témoigne de l'embarras où on peut se trouver quelquefois pour poser un diagnostic rigoureux et prendre les responsabilités qu'il comporte.

Le 30 juillet, trois personnes sont mordues par un chien connu, n'ayant présenté jusqu'alors aucun symptôme de rage : on cautérise les blessures avec de l'acide phénique à 50 0/0. Le lendemain, l'autopsie du chien, qu'on avait assommé, conclut à l'absence de signes de rage.

Le 19 août, l'un des mordus meurt de rage. Les deux autres partent de suite pour l'Institut Pasteur. Depuis, rien de nouveau de ce côté.

Mais, le 18 août, un individu est blessé à la main par les dents d'un chien malade, dont il essayait d'écarter les mâchoires pour lui faire absorber de l'huile de ricin. Le 19 au matin, ce chien donne des signes de rage ; il est abattu en même temps que deux autres chiens et un chat qu'il venait de mordre, et on apprend alors qu'il avait été lui-même mordu le 30 juillet par le chien dont nous venons de parler. L'individu blessé à la main a subi le traitement antirabique et va toujours bien, mais on

aurait pu éviter ces répercussions et la mort de l'un des mordus si on avait eu à Tunis un laboratoire permettant d'affirmer, par les résultats de l'inoculation, un état de rage que l'autopsie avait dû laisser douteux, et de commencer les vaccinations antirabiques sur place en attendant le résultat de l'inoculation du bulbe de l'animal suspect.

REVUES ET ANALYSES

E. KLEIN, Etiologie de la diphtérie, 20th *annual Report*, 1892.

Dans le numéro de novembre 1893 de ces *Annales*, nous avons signalé la contradiction qui existait entre M. Klein et M. Abbott sur les résultats de l'inoculation à la vache du bacille de la diphtérie humaine. M. Klein avait conclu de ses expériences que la vache ainsi inoculée pouvait présenter sur ses mamelles des lésions capables de devenir la source d'une contagion nouvelle, et que son lait pouvait aussi contenir des bacilles diphtéritiques dangereux. Tout en s'accordant avec M. Klein au sujet de la maladie interne que subissait sa vache inoculée, M. Abbott n'avait réussi à observer ni l'éruption sur la mamelle, ni le passage des bacilles dans le lait, et ses expériences diminuaient ainsi la portée pratique des constatations de M. Klein. Je disais, à ce propos, qu'il était prudent de ne prendre parti ni pour l'un ni pour l'autre de ces savants, attendu qu'ils pouvaient avoir raison tous les deux, le passage des bacilles dans le lait restant toujours possible, s'il n'était pas toujours réalisé.

Un travail nouveau de M. Klein, que je ne connaissais pas quand j'écrivais mon compte rendu, est tout à fait en faveur de cette opinion, car il montre que si l'éruption sur la mamelle et le passage des bacilles dans le lait ne sont pas chose rare, ils ne sont pourtant pas des phénomènes constants. Ainsi deux vaches, inoculées avec une culture de bacille diphtéritique dérivée d'une vache morte à la suite d'une inoculation du bacille de la diphtérie humaine, sont mortes toutes deux avec de graves désordres internes, mais sans présenter d'éruption sur les tétines, et sans que les bacilles aient passé dans le lait. Par contre, deux vaches, inoculées de la même façon avec un bacille un peu atténué par une longue culture sur gélose, se sont rapidement rétablies, mais toujours sans présenter d'éruption sur les mamelles ni de bacilles dans leur lait. Dans une autre série d'expériences, au contraire, on a observé des ulcères sur les pis, et le lait de la même vache a présenté tantôt des bacilles et tantôt pas. Le danger d'une contamination par le lait provenant de ces vaches malades est donc, il semble, moins grand qu'on n'aurait pu le craindre d'après les premiers résultats de M. Klein

et, là aussi, il faut sans doute compter avec le degré de virulence du microbe, si variable, comme on sait, chez le bacille de la diphtérie.

Mais, ces réserves faites, il faut se dire aussi que les faits positifs du passage du bacille dans le lait sont d'un poids bien plus grand que les faits négatifs. De ce qu'on n'est pas toujours écrasé par un omnibus, il ne faut pas conclure qu'il n'y a pas à s'en garer, et, précisément dans ce même travail, M. Klein cite deux cas dans lesquels, en allant visiter une vacherie dont le lait était accusé d'avoir semé la diphtérie dans sa clientèle, on a trouvé, sur les pis des vaches laitières, des papules et des ulcères tout à fait analogues à ceux qu'on trouvait sur les mamelles des vaches inoculées avec le bacille de la diphtérie humaine. Dans la symbiose qui s'est établie entre les animaux domestiques et nous, il y a, comme dans toutes les symbioses, un échange constant de bons et de mauvais services. La vache nous sert et nous nuit. Dans cet ordre d'idées, et toujours à propos de la diphtérie, nous trouverions dans le travail de M. Klein de quoi faire aussi le procès des chats. Mais il ne faut pas se brouiller à la fois avec tous ses amis, surtout quand on s'est déjà aliéné les perruches.

Dx.

FR. ELFVING. Sur l'irritabilité des plantes. *Ofv. af Finska Vet. Soc. Forhandlingar.*

Les lecteurs des *Annales* n'ont pas perdu le souvenir d'un curieux travail (T. V, p. 401) dans lequel M. Elfving montrait que les tubes sporangifères du *Phycomyces nitens* s'inclinent vers un morceau de fer ou d'acier placé dans leur voisinage, tandis que le voisinage d'une plaque de cuivre les laisse indifférents. Un certain nombre de corps, la cire à cacheter, la colophane, la soie, le caoutchouc, le bois, le soufre agissent comme le fer, et au milieu de cette variété de corps actifs, on ne voit pas de propriété commune à laquelle on pourrait rattacher l'effet produit. M. Elfving n'avait pas hasardé d'explication, tout en inclinant à voir dans le phénomène une sorte d'effet d'irradiation, en relation avec la structure interne des corps actifs.

À la réunion qu'a tenue à Édimbourg, en 1892, l'Association britannique, et dans le tome VI des *Annales de botanique*, M. L. Errera a attribué le fait à une espèce d'hydrotropisme. Le *Phycomyces nitens* fuit, comme on sait, les surfaces humides. Si on admet que le fer diminue l'état hygrométrique à son voisinage, les sporanges de la plante subiront de son côté une attraction apparente qui sera une répulsion réelle du côté opposé. Mais le fer n'est guère hygrométrique.

Une lame de fer de 4,950 millimètres carrés de surface n'a pris, dans une expérience de M. Elfving, que 3 mg. 5 d'eau en 24 heures dans une atmosphère saturée. D'un autre côté, des bâtons ou des plaques de substances très hygrométriques, de potasse, de chlorure de calcium, sont sans action sur le *Phycomyces*. Il faut donc renoncer à cette explication.

Voici, du reste, des faits nouveaux qui, s'ils ne donnent pas l'explication du phénomène, semblent au moins le faire revenir dans la région où M. Elfving l'avait placé tout d'abord, dans celle des phénomènes de radiations ou de vibrations moléculaires. Le platine est un métal inactif sur le *Phycomyces*. Exposé au soleil, il devient actif. Cette faculté se manifeste tant du côté éclairé que de l'autre. Elle dure quelques heures, puis elle disparaît.

M. Elfving voit là une sorte de phosphorescence, faite de rayons invisibles pour nous, mais auxquels la plante est sensible. Il rappelle, à ce sujet, que dans ses belles études sur la phosphorescence, E. Becquerel avait dit : « Même si les corps ne sont pas lumineux dans le phosphoroscope, on ne peut dire qu'il n'existe aucun effet après l'action du rayonnement, car la lumière pourrait exciter des vibrations d'une autre vitesse que celles qui sont perceptibles à nos yeux (et, en général, plus lentes), et capables de donner lieu, soit à des effets de chaleur, soit à d'autres actions moléculaires encore inconnues ».

C'est une indication : ce n'est pas encore une explication, et, pour le moment, il n'y a qu'à recueillir des faits. C'est à quoi s'applique M. Elfving. Il a vu, par exemple, que 70 minutes d'insolation à un vif soleil du mois d'août suffisaient à rendre active une plaque que cinq heures d'exposition à un temps couvert laissaient inerte. On ne saurait pourtant voir là un effet calorifique, car la plaque restait inactive après avoir été chauffée pendant des heures à la température qu'elle atteignait au soleil. D'un autre côté, les rayons ultraviolets n'ont pas d'action prépondérante, car la lumière conserve son action même lorsqu'on la filtre à travers une solution de sulfate de quinine. Il faut donc, au moins jusqu'ici, renoncer à une explication d'ordre chimique.

La chaleur, qui est sans action sur le platine, en a une sur le zinc. Un bâton de zinc chauffé au chalumeau jusqu'à commencement de fusion, et laissé ensuite refroidir jusqu'à ce qu'aucune chaleur ne fût sensible à la main, a donné en quelques heures, au *Phycomyces*, les plus belles courbures qu'on puisse voir. Après quelques heures, ce même bâton était devenu inactif. Au contraire le platine, le cuivre, le cobalt, le nickel, l'étain, le plomb et le verre sont toujours inactifs, à quelque degré qu'on les chauffe.

Tout cela est curieux, comme tout ce qui avoisine cette région un peu mystérieuse des effets à distance, autour de laquelle on a tourné sans y mettre encore franchement le pied. Qu'il y ait dans le mesmérisme, dans le braidisme, dans la suggestion, dans la métallothérapie, des faits exacts, c'est ce dont personne ne doute; que les réalités y soient mélangées à des visions pures, c'est ce qu'il est impossible de contester. Le difficile est de démêler les illusions des réalités, de faire la part de l'emballlement du médecin et de la rouerie consciente ou inconsciente du sujet. Si on trouvait des plantes hypnotisables, elles seraient bien préférables à l'homme, qui est également redoutable comme sujet d'expériences, qu'il soit intelligent ou qu'il ne le soit pas.

Dx.

INSTITUT PASTEUR

Personnes prises de rage au cours du traitement.

NEMESIO OLLERO, 52 ans, de Debicho, province de Cordoue, Espagne. Mordu le 15 décembre 1893, par un chien reconnu enragé après examen vétérinaire : traité à l'Institut Pasteur depuis le 26 décembre.

Les morsures au nombre de trois étaient situées sur la lèvre supérieure et sur la joue gauche : elles n'avaient subi aucune cautérisation. Les premiers symptômes rabiques se sont manifestés le 2 janvier : transporté à l'hôpital Necker, OLLERO y est mort le 5 janvier.

RAMON FRANCESCA née CARBONNELL, 53 ans, de Pozzo-Blanco, province de Cordoue, Espagne.

Mordue le 18 décembre 1893, par le même chien que OLLERO, traitée à l'Institut Pasteur à partir du 5 janvier.

Les morsures au nombre de six étaient situées sur les deux faces de la région métacarpienne de la main droite : elles étaient très pénétrantes, en deux endroits la main avait été transpercée; une cautérisation au fer rouge avait été pratiquée une heure après l'accident.

Le 23 janvier, F. CARBONNEL se plaint de démangeaisons dans la main mordue. L'appétit a disparu depuis plusieurs jours : le lendemain les symptômes s'aggravent, la malade est conduite à l'hôpital Necker, elle y meurt le 26 janvier.

10 autres personnes très gravement mordues par le même chien et traitées à l'Institut Pasteur sont actuellement en bonne santé.